UNIVERSITE DE TOULOUSE

FACULTE MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNEE 1962 N° 22

# Recherches botaniques biochimiques et physiologiques sur *Lycopodium Phlegmaria L.*

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN PHARMACIE

(DIPLOME D'ÉTAT)

*Présentée et soutenue publiquement le 11 Avril 1962*

PAR

Robert ROUFFIAC

Pharmacien
Licencié ès Sciences
Ingénieur-Chimiste
Assistant à la Faculté

MEMBRES DU JURY

Mme DULUCQ, *Présidente.*

MM. VALDIGUIÉ, ROUX, DOUSTE-BLAZY — *Assesseurs.*

IMPRIMERIE DU CENTRE — CAMILLI et FOURNIE
28, allée Jean-Jaurès, Toulouse

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546525_0054

*RECHERCHES BOTANIQUES*
*BIOCHIMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES*
*SUR*

# LYCOPODIUM PHLEGMARIA L.

UNIVERSITE DE TOULOUSE

FACULTE MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1962 N° 22

# Recherches botaniques biochimiques et physiologiques sur *Lycopodium Phlegmaria L.*

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN PHARMACIE

(DIPLOME D'ÉTAT)

*Présentée et soutenue publiquement le 11 Avril 1962*

PAR

**Robert ROUFFIAC**

Pharmacien
Licencié ès Sciences
Ingénieur-Chimiste
Assistant à la Faculté

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

MEMBRES DU JURY

Mme DULUCQ, *Présidente.*

MM. VALDIGUIÉ, ROUX, DOUSTE-BLAZY, *Assesseurs.*

IMPRIMERIE DU CENTRE — CAMILLI et FOURNIE
28, allée Jean-Jaurès, Toulouse

UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

# FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

## TABLEAU DU PERSONNEL

| | MM. |
|---|---|
| DOYEN | LAZORTHES |
| 1er Assesseur | BLANC |
| 2e Assesseur | N... |
| Doyens honoraires | GORSE, CALVET, LEFEBVRE, BRUSTIER |
| Professeurs honoraires | RIBAUT, VALLOIS, CLERMONT, NANTA, DUCUING, TAPIE, DELAS, RISER, SOULA. |

### SECTION MÉDECINE

#### PROFESSEURS

| | |
|---|---|
| Clinique médicale | MERIEL, GADRAT |
| Clinique chirurgicale et gynécologie | FABRE (P.) |
| Clinique chirurgicale et du Cancer | GRIMOUD |
| Clinique chirurgicale infantile et orthopédie | VIRENQUE |
| Clinique des maladies cutanées et syphilit. | BAZEX |
| Clinique des maladies de la Tuberculose et Pathologie interne | MOREL |
| Clinique des maladies des voies urinaires | LHEZ |
| Clinique médicale infantile et puéricul. | SOREL |
| Clinique de neurologie et de psychiatrie | CERAUD |
| Clinique obstétricale | GUILHEM |
| Clinique Odonto-Stomotologique | N.... |
| Clinique ophtalm. | CALMETTES |
| Clinique rhumatologique | RUFFIE |
| Clinique O.R.L. et de chirurgie maxillo-faciale | CALVET |
| Clinique traumatologique des membres | RIEUNAU |
| Accouchement et Obstétricie Sociale | PONTONNIER |
| Anatomie | LAZORTHES |
| Anatomie appliquée | POULHES |
| Anatomie pathologique. | FABRE (J.) |
| Bactériologie, hygiène, médecine sociale | ANDRIEU |
| Chimie Biologique | VALDIGUIE |
| Electroradiologie | MARQUES |
| Embryologie générale | BROUSSY (J.). |
| Histologie | BIMES |
| Hydrologie thérapeutique et climatologie. | DARNAUD |
| Médecine légale et du Travail | PLANQUES |
| Médecine Sociale | BOUNHOURE |
| Parasitologie | BOUISSET |
| Pathologie Chirurgicale. | DAMBRIN |
| Pathologie générale et médecine expériment. | SENDRAIL |
| Physico-Chimie | AUVERGNAT |
| Physiologie | LAPORTE (Y.) |
| Physiologie appliquée et Pharmacologie | BAISSET |
| Physique biologique et médicale | BUGNARD |
| Propédeutique médicale. | N... |
| Thérapeutique | DARDENNE |

#### PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

| | |
|---|---|
| Anatomie générale et comparée | COULOUMA |
| Pathologie Médicale | LAPORTE (J.) |
| Bactériologie | Mme ENJALBERT |

#### PROFESSEURS SANS CHAIRE

| | |
|---|---|
| Biochimie médicale | DOUSTE-BLAZY |
| Physique Médicale | BRU |

#### MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

| | |
|---|---|
| Anatomie | BASTIDE |
| Anatomie Pathologique. | BOUISSOU |
| Anesthésiologie | LARENG |
| Carcinologie | ESTRADE |
| Histologie et embryol. | PLANEL |
| Parasitologie | RUFFIE (J.) |
| Pathologie expériment. | GLEIZES |
| Physiologie | MONTASTRUC |
| | BESSOU |
| Physique médicale | COMMANAY |

#### AGREGES

| | |
|---|---|
| Médecine générale | MONNIER, RIBAUT, DELAUDE, RASCOL, CALAZEL |
| Chirurgie générale | ENJALBERT, FICAT, PASQUIE, SOUQUET, SARRAZIN |
| Dermatologie et syphil. | DUPRE |
| Hydrologie | DENARD |
| Médecine légale | GREZES-RUEFF |
| Obstétrique | ESPAGNO |
| Odontostomatologie | CADENAT (H.) |
| Pédiatrie | BARDIER |

#### AGREGES LIBRES

| | |
|---|---|
| Anatomie | THOMAS |
| Ophtalmologie | DEODATI |
| Oto-Rhino-Laryngologie. | CLAUX |
| Pathologie chirurgicale. | DIEULAFE |

### SECTION PHARMACIE

#### PROFESSEURS

| | |
|---|---|
| Botanique et cryptogamie | Mme DULUCQ-MATHOU |
| Chimie analytique, Toxicologie et Hyg. indust. | BOURBON |
| Chimie Pharmaceutique. | BLANC |
| Matière Médicale | VINCENT |
| Pharmacie chimique et pharmacodynamie | CAUJOLLE |
| Pharmacie galénique | STANISLAS |
| Zoologie | ROUX |

#### PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Pharmacie ..... COUTURIER

#### PROFESSEURS SANS CHAIRE

Sciences Naturelles ..... Mme CAUJOLLE

#### MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

| | |
|---|---|
| Microbiologie | BREUILLAUD |
| Sciences Physiques | PITET |
| Toxicologie | BROUSSY (G.) |

#### PERSONNEL ADMINISTRATIF

| | |
|---|---|
| Secrétaire Principal | ROCHE |
| Secrétaire | BERRUT |

*La Faculté déclare n'être pas responsable des opinions émises par les candidats*
(Délibération du 12 mai 1891)

A MA FAMILLE

A MES AMIS

**A NOTRE JURY DE THESE :**

MADAME DULUCQ
*Professeur de Botanique et Cryptogamie*

MONSIEUR VALDIGUIE
*Professeur de Chimie Biologique*

MONSIEUR ROUX
*Professeur de Zoologie*

MONSIEUR DOUSTE-BLAZY
*Professeur s.c.*

A NOS MAITRES
DE LA FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE
DE TOULOUSE

# AVANT-PROPOS

La « poudre de lycopode » ou « soufre végétal » fut préconisée de tous temps par les pharmacopées pour l'enrobage des pilules et Baumé la signale déjà en 1790 dans ses *Eléments de Pharmacie théorique et pratique.*

Quant à l'effet physiologique de la plante, il faut attendre la fin du XIX$^{e}$ siècle pour le déceler et, à la même époque, l'analyse chimique a démontré chez certaines espèces la présence de principes alcaloïdiques.

Il y a longtemps cependant que la médecine populaire en fait un assez large usage (Amérique du Sud, Pologne, notamment). Dans ces dernières années, il a été porté à notre connaissance l'utilisation par les populations de Madagascar de certaines espèces de Lycopodes, parmi lesquelles *Lycopodium phlegmaria* L. ; elles mettent à profit ses propriétés jugées stimulantes pour les enfants, excitantes pour les travailleurs ou les guerriers ; elles l'utiliseraient également comme doping pour les animaux (combats de coq) et lui attribueraient aussi des propriétés narcotiques et euphorisantes.

Ainsi absorbée sous forme d'infusé aqueux, de boisson alcoolique (région d'Ampanavoana), de poudre mélangée aux aliments ou servant à la fabrication de cigarettes, cette substance, qui prend ainsi à nos yeux tous les caractères d'une véritable drogue, est désignée dans ces contrées sous divers noms : *Jia, Somorona, Manjato,* qui recouvrent parfois des espèces et même des genres différents.

M$^{me}$ le Professeur Dulucq nous a proposé une étude botanique, biochimique et physiologique de *Lycopodium phlegmaria* L., qui ne semble guère, à ce jour, avoir donné lieu à des recherches.

Qu'elle nous permette de lui exprimer ici tous nos sentiments de respectueuse amitié et de reconnaissance pour toute l'aide qu'elle nous a généreusement dispensée dans la conduite de cette étude, et l'intérêt dont elle a toujours fait preuve à l'égard de nos recherches et de nous-même.

M. le Professeur Valdiguié a bien voulu nous faire l'honneur de juger ce travail et nous tenons à lui exprimer notre respectueuse reconnaissance pour tous ses conseils, pour l'aide qu'il nous a fournie et pour la bienveillance qu'il n'a cessé de nous témoigner.

Sans l'appui que nous a largement procuré M. le Professeur Roux, nous n'aurions pas pu mener à bien les travaux d'ordre physiologique pour lesquels il nous a judicieusement conseillé. Nous lui renouvelons l'expression de notre respectueuse amitié.

M. le Professeur Douste-Blazy nous témoigne également son amitié en siégeant à notre Jury de thèse. Nous lui faisons part ici de notre reconnaissante sympathie pour les conseils de tous ordres qu'il nous a toujours donnés si aimablement et si simplement.

Nous regrettons que M. le Professeur Delas n'ait pu participer à notre Jury de thèse et nous tenons à lui faire part de nos sentiments respectueusement reconnaissants pour l'accueil qu'il nous a réservé dans son laboratoire

Nous remercions bien vivement aussi M. le Professeur Pitet de s'être intéressé à nos travaux et de nous avoir conseillé dans le domaine de l'interprétation des spectres ultra-violets, ainsi que M. le Professeur Mathis et M^me^ Mathis, chargée de recherches au C.N.R.S., pour toute l'aide qu'ils nous ont apportée dans le domaine de la spectrographie infra-rouge. Nous n'oublions pas également que M. Montant, chef de travaux à la Faculté des Sciences, nous a fort aimablement aidé sur un chapitre particulier et nous lui en sommes reconnaissant.

La réalisation de ce travail n'a été possible que grâce au soutien de tous les membres du Service de Botanique et en particulier de M^me^ Edy, assistante, à qui nous témoignons notre reconnaissante amitié.

Nous remercions également tous les collaborateurs du Laboratoire de Zoologie pour l'aide qu'ils nous ont apportée dans nos recherches.

L'étude chimique des alcaloïdes de *Lycopodium phlegmaria* L. n'a pu être poursuivie que grâce à M. le Professeur Mac Lean, d'Ontario, et M. le Professeur Ayer, d'Alberta, qui nous ont envoyé les alcaloïdes de référence et ont bien voulu également nous adresser quelques conseils et renseignements. Qu'ils veuillent trouver ici l'expression de notre gratitude.

Enfin, nous devons vivement remercier M. Paulian, directeur de l'Institut d'Etudes Centrafricaines de Brazzaville, précédemment à Madagascar, qui a le premier attiré notre attention sur ce sujet et M. Heiby, directeur du Laboratoire de Police Judiciaire au Ministère de l'Intérieur, à Tananarive, qui s'intéresse depuis longtemps à l'usage que font les indigènes de nombreuses plantes de l'Ile, et nous a procuré avec beaucoup de complaisance tout le matériel végétal, malgré les difficultés rencontrées. Il nous a également fourni tous les renseignements géographiques et sociologiques concernant la drogue. Qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance.

# PLAN

## PREMIERE PARTIE : **ETUDE BOTANIQUE**

I. — *Répartition géographique.*
II. — *Etude morphologique.*
III. — *Etude anatomique.*
IV. — *Essais de localisation des principes actifs alcaloïdiques.*
V. — *Conclusions.*

## DEUXIEME PARTIE : **ETUDE CHIMIQUE**

**Travaux antérieurs :**

I. — *Premières découvertes.*
II. — *Etude chimique des différentes espèces de Lycopodes.*
III. — *Etude de la structure des alcaloïdes de Lycopode.*
IV. — *Biogénèse des alcaloïdes de Lycopode.*

**Travaux personnels :**

I. — *Procédés d'extraction et examens préliminaires.*
II. — *Etude des alcaloïdes :*
  1° Essais sur le bloc alcaloïdique ;
  2° Fractionnement des alcaloïdes ;
  3° Purification des alcaloïdes ;
  4° Etude de la structure des alcaloïdes isolés et essais d'identification.
III. — *Conclusions.*

## TROISIEME PARTIE : **ACTIVITE PHYSIOLOGIQUE**

**Travaux antérieurs.**

**Travaux personnels :**

I. — *Etude toxicologique :*
  a) Symptomatologie de l'intoxication de diverses espèces animales ;
  b) Détermination des doses toxiques.
II. — *Effets physiologiques :*
  a) Essais sur Lapins ;
  b) Etude sur cœur de Grenouille in situ ;
  c) Etude sur intestin isolé de Rat.
III. — *Recherches biochimiques.*
IV. — *Conclusions.*

## **CONCLUSIONS GENERALES**

PREMIÈRE PARTIE

# Etude Botanique de Lycopodium Phlegmaria L.

# INTRODUCTION

Le genre *Lycopodium*, dont on connaît un millier d'espèces, est dispersé sur tous les continents. Il comprend deux sous-genres :

— Le sous-genre Rhopalostachya, dont les types sont les plus évolués, à ramification monopodique, souvent avec un axe principal, et possédant des sporophylles toujours différents des feuilles stériles. Les spores sont réticulées ou échinulées. La plupart sont des plantes terrestres non grimpantes. Citons parmi elles : *Lycopodium annotinum* L., *Lycopodium clavatum* L., *Lycopodium cernuum* L., *Lycopodium complanatum* L.

— Le sous-genre Urostachya, plus primitif, à ramification dichotome, ne possédant pas de racines adventives le long de la tige. Une partie ne présente aucune différence entre feuilles fertiles et feuilles stériles, une autre partie possède deux types de feuilles. Les spores sont sans aucun appendice. Ce sont des espèces dressées ou pendantes, certaines épiphytes. Dans ce groupe, nous trouvons : *Lycopodium selago* L., *Lycopodium saururus* Lam., et *Lycopodium phlegmaria* L., qui fait l'objet de cette étude. Il a été décrit, pour la première fois, par Linné en 1853 dans son *Species plantarum*. Pour certains auteurs il s'appelle *Urostachys phlegmaria* (40) ou *Lycopodium longifolium* Swartz (28).

FIG. 1. — *Carte de Madagascar*

● Principales stations de *Lycopodium phlegmaria* (communiquées par le Directeur du Laboratoire de Police, Ministère de l'Intérieur, République Malgache).

## 1° REPARTITION GEOGRAPHIQUE DE LYCOPODIUM PHLEGMARIA

C'est une espèce tropicale ou subtropicale, qui a été signalée à Ceylan, au Malabar, en Nouvelle-Zélande et aux Hawaï. On la trouve également en Afrique (Gabon, Cameroun) (73), à la Réunion et à Madagascar (28), parmi quelques vingt autres espèces de lycopodes.

A Madagascar, dont sont originaires les échantillons étudiés, les principales stations où l'on rencontre *Lycopodium phlegmaria* L. sont portées sur la carte ci-jointe. On peut voir qu'il est surtout abondant le long de la côte est de l'Ile. Du nord au sud, nous le rencontrons dans les régions d'Antalaha, de Mananara, de Tamatave, de Vatomandry et de Mananjary. Plus rarement, nous le trouvons à l'intérieur de l'Ile (à l'ouest d'Ambositra).

Son habitat normal est la forêt humide à une altitude variable. Plante épiphyte, il croît de préférence sur les raphias et les manguiers.

## 2° ETUDE MORPHOLOGIQUE

*Lycopodium phlegmaria* L., appelé communément Epaulette, est une plante épiphyte à tiges pendantes, subligneuses, cannelées, de plusieurs dizaines de centimètres de longueur (nous avons trouvé des échantillons qui dépassaient 60 et même 90 cm), à division dichotome. Souvent, plusieurs tiges partent d'une même souche.

Les tiges jeunes sont vertes et souples, mais les tiges âgées, qui peuvent atteindre 8 à 9 mm de diamètre, sont très rigides et de coloration rouge brunâtre. Elles sont recouvertes d'un enduit cireux brillant.

L'appareil radiculaire, à la base des tiges, est très réduit. Il comporte un grand nombre de petites racines adventives qui se séparent en deux très rapidement peu après la sortie de la tige.

La plante possède deux sortes de feuilles : les feuilles stériles et les sporophylles :

— les premières sont insérées sur la tige de façon spiralée assez irrégulière, pouvant parfois, sur les tiges les plus âgées, être considérées comme verticillées par quatre. Elles sont vertes, recouvertes d'un enduit cireux brillant, coriaces, subsessiles, dilatées à la base qui est irrégulière ; elles sont acuminées et possèdent une nervure médiane plus nette sur la face inférieure. Leur longueur, pour les plus grandes est de 2 cm et leur largeur à la base 1 cm ;

Fig. 2. — *Lycopodium phlegmaria L.*

— les sporophylles sont de taille beaucoup plus réduite (1 mm de longueur et autant de largeur) et groupées à l'extrémité des rameaux en strobiles pouvant atteindre 20 cm de long, plusieurs fois ramifiés dichotomiquement. Ces sporophylles cachent des sporanges de même longueur, ce qui est un caractère qui différencie *Lycopodium phlegmaria* de l'espèce très voisine *Lycopodium warneckei* (73) ;

— les spores sont tétraédriques et lisses, caractère qui confirme son appartenance au sous-genre Urostachya (72).

## 3° ETUDE ANATOMIQUE

A. — **Racine :**

a) Nettement au-dessus de la ramification, la section est circulaire. L'écorce est constituée moitié par un collenchyme fortement épaissi (partie externe), moitié par un parenchyme (partie interne). Un endoderme isole la stèle centrale. Dans celle-ci, le phloème forme un massif circulaire situé latéralement et entouré par le bois sur la moitié de son périmètre. Le xylème, en effet, se développe à partir de deux pôles ligneux qui encadrent le liber, et constitue un arc qui relie les deux pôles. L'ensemble prend la forme d'un U qui enserre le liber.

b) Si la section est pratiquée peu avant la ramification, nous constatons que la séparation des stèles est déjà réalisée dans l'organe : il y a une symétrie bilatérale, deux stèles semblables se font face, les deux massifs libériens étant les plus rapprochés.

c) En dessous de la bifurcation, nous retrouvons évidemment une seule stèle et une structure semblable à la première, mais l'organe étant plus jeune, très fréquemment le métaxylème n'est pas encore développé et le centre de la stèle est encore indifférencié.

B. — **Tige :**

Sa section présente un contour irrégulier, cannelé profondément.

Les cellules de l'épiderme sont épaissies et cuticularisées. De place en place, on rencontre des stomates.

La région corticale est très développée sous forme de parenchyme qui s'épaissit dans la partie externe et se transforme rapidement en sclérenchyme dans les tiges âgées. Ce parenchyme est constitué par des cellules polygonales allongées longitudinalement avec des cloisons transversales obliques.

Plus profondément, nous rencontrons un endoderme assez distinct, souvent dédoublé en certains points, qui isole une stèle dont les dimensions sont réduites par rapport à la zone corticale (son diamètre est compris entre le 1/5 et le 1/10 du diamètre total de la section). L'endoderme est séparé des éléments conducteurs par un péricycle à deux ou trois assises de cellules.

Les éléments vasculaires des tiges jeunes comme des tiges âgées, sont disposés selon le type actinostèlique, ainsi que l'indiquait Smith (72) avec de nombreuses pointes de protoxylème (15 signalées, nous en avons compté jusqu'à 18). Ceci correspond à un type assez primitif. Les espèces plus évoluées sont plutôt du type plectostèlique et haplostèlique (d'après Hill [41]) dans les tiges âgées.

Le métaxylème est, bien entendu, constitué par des vaisseaux scalariformes.

Un fait à signaler est la présence constante de plusieurs petites stèles (quatre en général), situées autour de la stèle centrale, à une distance variable de celle-ci. Chacune comporte quelques vaisseaux de bois entourés d'un endoderme. Le phloème ne semble pas visible.

Des coupes, pratiquées à différents niveaux, nous ont permis de constater que ces petites stèles correspondent à des traces foliaires courant obliquement dans le parenchyme.

C. — **Feuille :**

La section possède une symétrie bilatérale.

L'épiderme cuticularisé présente des stomates sur la face inférieure seulement. Les cellules stomatiques contiennent de l'amidon. Le parenchyme cortical est constitué par des cellules rondes laissant entre elles de petits méats. Il n'y a pas de tissu palissadique.

L'appareil conducteur, semblable aux traces foliaires observées dans la tige, est réduit : une seule nervure comprenant quelques éléments de xylème entourés par un endoderme assez peu visible. Le phloème ne semble pas distinct.

## 4° ESSAIS DE LOCALISATION DES PRINCIPES ACTIFS ALCALOIDIQUES

Les principes actifs de la plante étant de nature alcaloïdique, comme nous le verrons plus loin, il nous a paru nécessaire d'essayer de localiser ceux-ci dans les différents organes.

Nous avons utilisé divers réactifs des alcaloïdes : solution d'iode, chlorure d'or, réactif de Dragendorff dilué et concentré.

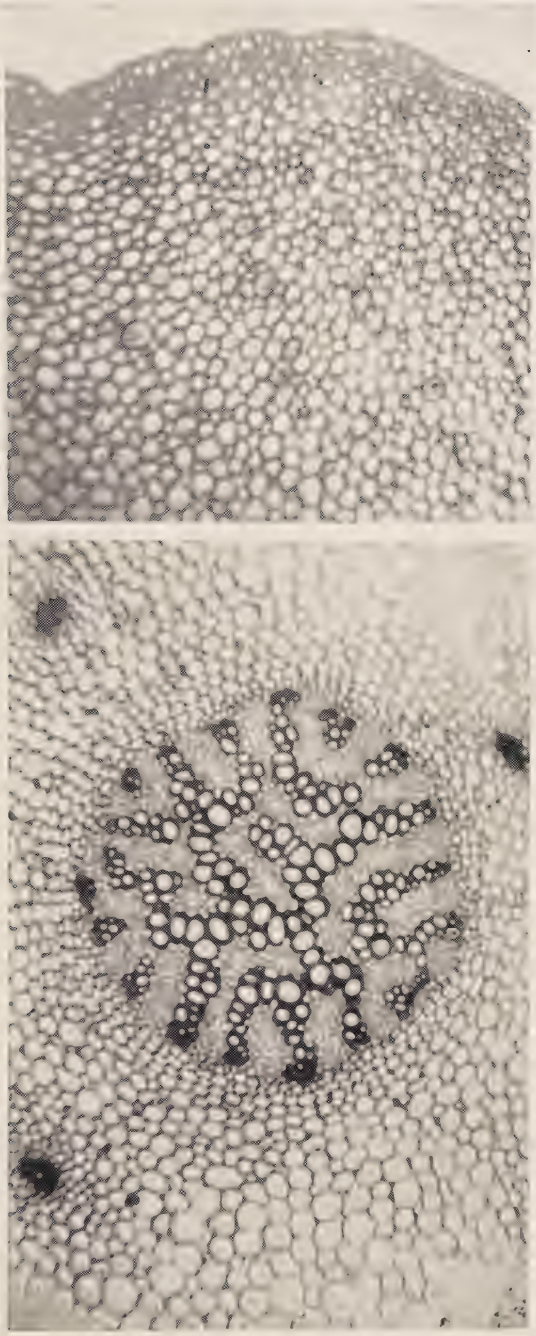



FIG. 3. — *Section transversale de la tige de* Lycopodium phlegmaria *L.*

A. — Parenchyme cortical externe (en noir : cellules à alcaloïdes)
B. — Cylindre central

C'est avec ce dernier que nous avons obtenu les meilleurs résultats.

Nous avons décelé la présence des alcaloïdes dans la tige, les racines et les feuilles. Ils nous ont semblé absents des sporophylles et des sporanges ainsi que des spores.

A. — **Racine :**

C'est ici que les cellules à alcaloïdes semblent les plus nombreuses : elles sont localisées, d'une part, immédiatement sous l'épiderme et, d'autre part, dans l'écorce à la limite du collenchyme et du parenchyme.

B. — **Tige :**

Sur des coupes pratiquées à différents niveaux, entre la base et le sommet, nous avons trouvé des cellules contenant des alcaloïdes dans la partie externe de l'écorce, sous l'épiderme. Ces cellules sont plus abondantes dans certaines zones mais semblent en général disséminées. Elles paraissent fort rares, sinon absentes, dans la zone interne et n'ont pu être mises en évidence à l'intérieur du cylindre central.

C. — **Feuille :**

Les cellules contenant des alcaloïdes sont peu nombreuses et exclusivement disposées sous l'épiderme inférieur.

En conclusion, les alcaloïdes existent dans les trois parties de l'appareil végétatif, avec, semble-t-il, prédominance relative dans la racine, autant qu'il est permis de l'affirmer, étant donné la fugacité des réactions d'identification. Les cellules qui contiennent les alcaloïdes ne se différencient pas anatomiquement des cellules voisines.

*Remarque.* — Ayant constaté que la poudre de la plante se colorait en rouge violacé par l'acide sulfurique concentré, nous avons traité des préparations micrographiques au moyen de ce réactif et nous avons remarqué que la coloration rouge se développait essentiellement dans certaines portions de la zone sous-épidermique de la tige, accessoirement, au voisinage des traces foliaires.

Dans la racine, la zone qui se colore correspond à la partie du parenchyme cortical qui entoure la stèle.

## 5° CONCLUSIONS

Après avoir donné quelques précisions concernant l'habitat de *Lycopodium phlegmaria* L., à Madagascar, nous avons pu réaliser une étude morphologique qui a confirmé les travaux précédemment effectués. Toutefois, les dimensions atteintes par beaucoup de nos échantillons dépassent souvent nettement celles signalées dans la littérature (73).

La structure anatomique a été étudiée au moyen de coupes pratiquées à des niveaux successifs dans les principaux organes : racine, tige, feuille. L'étude de la racine a mis en évidence la division du cylindre central nettement avant la ramification dichotomique, ce qui donne à une partie de l'axe commun une structure bilatérale assez particulière. Dans la tige la structure actinostèlique signalée a été retrouvée, avec toutefois un plus grand nombre de pôles ligneux que prévu (18 au lieu de 15 maximum indiqués). L'appartenance de *Lycopodium phlegmaria* L. à un type assez primitif est donc confirmée.

Enfin, la localisation microchimique des alcaloïdes a permis de constater qu'ils étaient contenus dans tous les organes végétatifs : les cellules qui les renferment ne présentent aucun caractère particulier de différenciation.

DEUXIÈME PARTIE

# Etude chimique de Lycopodium Phlegmaria L.

# TRAVAUX ANTÉRIEURS

## 1° PREMIERES DECOUVERTES

Dès 1881, Bodeker (17) signale la présence d'alcaloïdes dans *Lycopodium complanatum* L. (appelé par d'autres auteurs *flabelliforme*). Il donne le nom de « lycopodine » à l'alcaloïde extrait, auquel il assigne la formule $C_{32}H_{52}O_3N_2$.

Peu après, Capdeville (26) et Adrian (5) découvrirent « un » alcaloïde dans *Lycopodium saururus* Lam. : la « pillijanine », du terme « pillijan » désignant la plante en Amérique du Sud où elle était utilisée comme purgatif et abortif.

Arata et Canzoneri (10) étudièrent également *Lycopodium saururus* Lam., mais les méthodes utilisées alors ne permettaient pas un examen détaillé de la structure des alcaloïdes, ni même un fractionnement convenable de ceux-ci.

Il fallut ensuite attendre 1931 pour que Dominguez (32) reprenne des travaux du même ordre, et isole de *Lycopodium saururus* Lam. un alcaloïde de formule brute $C_{15}H_{24}ON_2$.

De 1934 à 1937, Muszynski (63) étudie *Lycopodium selago* L., *annotinum* L. et *complanatum* L., isolant de chacun d'eux, respectivement, la sélagine, l'annotinine et la complanatine, bientôt suivies de la clavatine (à partir de *Lycopodium clavatum* L.) et de l'inundatine (*Lycopodium inundatum* L.).

En 1938, Achmatowicz et Uzieblo (3) étudient *Lycopodium clavatum* L., et montrent que la clavatine est en réalité constituée par trois alcaloïdes différents :

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Lycopodine (*) | $C_{16}H_{25}ON$ | Pt de fusion : | 115/116° | 83 % |
| Clavatine | $C_{16}H_{23}O_2N$ | | 212/213° | 12 % |
| Clavatoxine | $C_{17}H_{27}O_2N$ | | 185° | 3 % |

## 2° ETUDE SYSTEMATIQUE DES DIFFERENTES ESPECES DE LYCOPODES

C'est en 1942 que Manske et Marion (47) publient les premiers résultats de leurs travaux qu'ils devaient poursuivre de nombreuses années, en explorant la plupart des espèces de Lycopodes du Canada.

(*) Ne pas confondre avec la lycopodine de Bodeker, mélange d'alcaloïdes.

Dans *Lycopodium complanatum L.*, ils découvrent 8 alcaloïdes qu'ils appellent : L 1 $C_{18}H_{31}ON$ ou complanatine
L 2 $C_{18}H_{29}O_2N$
L 3 $C_{18}H_{31}O_2N$
L 4 $C_{16}H_{27}N$
L 5 $C_{18}H_{28}O_2N_2$
L 6 $C_{18}H_{28}ON_2$ ou obscurine, car trouvée dans *Lycopodium obscurum* L.
L 7 $C_{16}H_{25}ON$ ou lycopodine
et la nicotine.

Ces auteurs utilisent pour l'isolement de leurs alcaloïdes des procédés physico-chimiques essentiellement, comportant la distillation fractionnée et des cristallisations successives. Ils identifient les alcaloïdes par le point de fusion soit de la base, soit d'un sel (picrate ou perchlorate).

A la même époque, Deulofeu et de Langhe (31) étudient *Lycopodium saururus* Lam. et en isolent deux bases : la saururine $C_{10}H_{19}N$ et la sauroxine $C_{17}H_{26}ON_2$ sous forme de picrates.

En 1943, dans *Lycopodium annotinum* L. (48) les auteurs Marion et Manske trouvent huit alcaloïdes, dont le principal est un nouveau qu'ils appellent annotinine : $C_{16}H_{21}O_3N$ (L 7). Les autres sont :

L 6 $C_{18}H_{28}ON_2$ (obscurine)
L 8 $C_{16}H_{25}O_3N$
L 9 $C_{20}H_{25}O_2N$
L 10 $C_{16}H_{27}ON$
L 11 $C_{16}H_{21}O_3N$
L 12 $C_{18}H_{25}O_3N$
et la lycopodine.

En 1944, dans *Lycopodium tristachyum* Pursh. (49), ils isolent outre la nicotine en petite quantité et la lycopodine, trois nouveaux alcaloïdes : L 13 $C_{16}H_{25}ON$, trouvé également dans *Lycopodium obscurum* L. (50), L 14 $C_{16}H_{25}N$ et L 15 $C_{20}H_{31}O_4N$, tous trois en faible quantité (0,01 %).

La même année, les auteurs étudient *Lycopodium clavatum* L. (51), d'origine canadienne, et retrouvent la nicotine, la lycopodine, l'alcaloïde L 13, plus deux nouveaux : L 18 : $C_{11}H_{19}ON$ et L 19 dont la formule n'a pas été calculée, la quantité obtenue étant trop faible. Le rendement en alcaloïdes est de 0,145 % du poids sec.

Nous avons déjà vu que d'un *Lycopodium clavatum* d'origine européenne, Achmatowicz et Uzieblo (3) ont obtenu la clavatine et la clavatoxine non retrouvée ici, ce qui donne à penser aux chercheurs canadiens qu'il pourrait s'agir de deux espèces différentes.

Dans *Lycopodium obscurum*, variété *dendroideum* Michx. et D.C. Eaton (50), les mêmes auteurs retrouvent la lycopodine et l'obscurine déjà rencontrées, L 13, trouvé également dans *Lyco-*

*podium tristachyum,* et deux nouveaux qui sont L 16 (isomère de la lycopodine) et L 17 de formule $C_{18}H_{27}O_3N$.

1946 : Dans *Lycopodium lucidulum* Michx. (52), Marion et Manske mettent encore en évidence la lycopodine et L 13, ainsi qu'une faible quantité de nicotine. En outre, ils découvrent les nouveaux alcaloïdes, isolés en très petite quantité :

L 20 $C_{17}H_{27}O_2N$
L 21 $C_{13}H_{21}ON$
L 22 $C_{16}H_{27}ON$
L 23 $C_{16}H_{25}O_2N$
L 24 $C_{16}H_{25}ON$
L 25 $C_{16}H_{25}O_2N$

Dans *Lycopodium sabinaefolium* Willd. (53), les mêmes retrouvent la lycopodine, la nicotine et L 13, plus un nouvel alcaloïde : L 26 $C_{15}H_{25}ON$.

En 1947, c'est *Lycopodium annotinum* variété *acrifolium* Fern. (54) qu'ils étudient et ils y retrouvent l'annotinine et la lycopodine, mais non les autres alcaloïdes isolés de *Lycopodium annotinum* L. (voir plus haut), et par contre cinq nouveaux sont isolés sous forme de perchlorates :

L 27 $C_{16}H_{23}O_2N$ ou acrifoline
L 28 $C_{17}H_{27}O_2N$
L 29 $C_{16}H_{23}O_2N$
L 30 $C_{16}H_{25}O_2N$
L 31 $C_{20}H_{29}O_4N$

Les auteurs en déduisent qu'il doit s'agir, non d'une variété de *Lycopodium annotinum,* mais d'une espèce distincte.

En 1948, parallèlement à ces travaux de l'école canadienne, les Polonais s'intéressaient toujours à la question et Muszynski (64), cette année-là, publiait un article consacré essentiellement aux effets physiologiques de ces alcaloïdes, mais où il mit l'accent sur les différences de nomenclature pouvant créer des confusions entre alcaloïdes.

La même année, Marion et Manske, étudiant *Lycopodium cernuum* L. (57), ne peuvent y mettre en évidence la lycopodine. C'est la première espèce étudiée qui présente cette particularité.

En 1952, Bertho et Stoll (15) étudient un *Lycopodium annotinum* originaire d'Allemagne et trouvent des alcaloïdes différents de ceux de Manske et Marion ; s'ils retrouvent l'annotinine et la lycopodine, ils ne retrouvent ni l'obscurine, ni L 8, ni L 9, ni L 10, ni L 11 et L 12 et trouvent par contre l'acrifoline, isolée par Manske et Marion de la variété *acrifolium,* plus de nouvelles bases : annotoxine $C_{31}H_{42}O_3N_2$, une base isomère de la lycopodine $C_{16}H_{25}ON$, et un autre alcaloïde mal caractérisé : $C_{10}H_{21}N$ ou $C_{10}H_{19}ON$.

Achmatowicz et Rodewald (1), de leur côté trouvèrent peu de différence entre un *Lycopodium annotinum* de Pologne et celui canadien de Manske et Marion. D'après eux, la formule que Bertho et Stoll donnent pour l'annotine est inexacte et en réalité cette base est identique à L 11. L'annotoxine (dont la formule doit être $C_{32}H_{44}O_5N_2$) serait un composé moléculaire d'acrifoline et de L 11 ($C_{16}H_{23}O_2N$ et $C_{16}H_{21}O_3N$). Nos auteurs isolèrent en outre l'annotinine, l'α et β obscurines, L 8, la lycopodine, une base isomère de celle-ci ainsi que l'acrifoline. Des alcaloïdes isolés par Manske et Marion, il manquerait seulement L 9, L 10 et L 12.

D'après Achmatowicz et Rodewald, l'acrifoline pourrait avoir été présente dans l'une des fractions L 9 reportées par Manske et Marion (54). Quant à l'annotoxine, si ceux-ci ne l'ont pas isolée, c'est parce qu'ils obtenaient les bases cristallisées sous forme de perchlorates, brisant ainsi le complexe moléculaire.

Le Professeur Bertho a pu confirmer, d'autre part, d'après Perry et Mac Lean (70), que l'annotoxine était bien un composé moléculaire d'acrifoline et de L 11, L 11 étant lui-même identique à l'annotine.

Perry et Mac Lean (70), pour leur part, ont trouvé dans *Lycopodium annotinum* L. : l'annotinine, la lycopodine, l'obscurine, l'acrifoline, L 8, L 11, L 12 et l'annotoxine.

D'autre part, en 1953, Douglas, Lewis et Marion (33) montrent que L 30 isolé par Manske et Marion de *Lycopodium annotinum* v. *acrifolium* était identique à L 8, et il semble que les différences entre les deux variétés indiquées par Marion et Manske sont moins grandes qu'ils ne le pensaient tout d'abord, d'autant plus que les chercheurs européens n'ont pas retrouvé L 28, L 29 et L 31.

La même année, Manske (55) signale dans *Lycopodium densum* Labill (originaire de Nouvelle-Zélande), la présence de lycopodine et de deux nouveaux alcaloïdes : L 34 $C_{16}H_{25}O_2N$ et L 35 $C_{14}H_{21}ON$.

C'est seulement en 1958 que nous voyons découvrir un nouvel alcaloïde de lycopode par Anet et Eves (6) dans *Lycopodium annotinum* L. : la lycodine, de formule supposée $C_{17}H_{24}N_2$.

En 1958, Achmatowicz et Rodewald (2) isolent de *Lycopodium annotinum* L. les bases suivantes :

| | |
|---|---|
| base IV | $C_{10}H_{23}ON$ |
| base VI (= L 29 ?) | $C_{16}H_{23}O_2N$ |
| base VIII | $C_{16}H_{21}O_3N$ |
| base IX | $C_{17}H_{20}O_2N$ |
| base V (= L 28 ?) | $C_{17}H_{27}O_2N$ |

| | |
|---|---|
| base XI | $C_{18}H_{25}O_3N$ |
| base XII | $C_{18}H_{25}O_4N$ |
| base VII (= L 31 ?) | $C_{20}H_{19}O_4N$ |

En 1959, Anet et Khan (7), poursuivant l'étude de la même espèce, isolent, au moyen du procédé de contre-courant, quatre nouvelles bases :

| | |
|---|---|
| l'annofoline | $C_{16}H_{25}O_2N$ |
| la lycofoline | $C_{16}H_{25}O_2N$ |
| l'$\alpha$ et $\beta$ lofoline | $C_{18}H_{29}O_3N$ |

En 1959/1960, Burnell (24) retire de *Lycopodium fawcettii* Lloy et Underwood, les alcaloïdes suivants :

| | |
|---|---|
| base A | $C_{16}H_{27}O_2N$ |
| base B | |
| base C ou $\beta$ lofoline ou fawcettiine | $C_{18}H_{29}O_3N$ |
| base D ou désacétylfawcettiine | |
| base E | $C_{17}H_{25}O_2N$ |
| base F ou fawcettidine | $C_{16}H_{23}ON$ |
| base M | $C_{17}H_{27}O_2N$ |
| base O | $C_{20}H_{31}O_5N$ |
| base K ou acétylfawcettiine | $C_{20}H_{31}O_4N$ |
| base N ou diacétyllycofoline | $C_{20}H_{29}O_4N$ |

## 3° ETUDE DE LA STRUCTURE DES ALCALOIDES DE LYCOPODES

Jusqu'en 1948, l'étude poussée de la structure des alcaloïdes découverts dans les lycopodes n'a guère été réalisée. Signalons pourtant qu'en 1942 Marion et Manske (56) publient une étude réalisée sur la lycopodine (produits de dégradation sur le palladium). Ils concluent à la présence d'un noyau quinoline hydrogéné, et pensent que l'oxygène présent doit être sous forme d'éther cyclique.

En 1950, Mac Lean, Manske et Marion (46) publient de nouveaux travaux sur la lycopodine. Par hydrogénation, elle donne naissance à un alcool secondaire et fournit d'autres réactions indiquant que l'oxygène est sous forme cétonique et non oxydique. D'autre part, les auteurs étudient la dégradation de la lycopodine en passant par un dérivé cyanobromé. La dégradation d'Hofmann se révèle inefficace.

En 1952, Bertho et Stoll (15) étudient la structure de l'acrifoline et pensent qu'elle ne renferme ni $N\text{-}CH_3$, ni $O\text{-}CH_3$ ou OH mais contient probablement CO d'après le spectre U.V. D'autre part, l'annotine ne possèderait ni OH, ni $N\text{-}CH_3$, ni $O\text{-}CH_3$.

En 1953, Moore et Marion (60) étudiant la structure de l'obscurine, montrent qu'elle est constituée de deux bases différentes : l'α obscurine et la β obscurine, séparables par chromatographie sur alumine et leurs spectres I.R et U.V indiquent pour l'α obscurine deux groupements CO et NH voisins et une double liaison conjuguée avec le CO ; pour la β obscurine, un anneau d'α pyridone.

Les formules de l'α et β obscurines sont $C_{17}H_{24}ON_2$ et $C_{17}H_{26}ON_2$ (et non $C_{18}H_{28}ON_2$ trouvé pour l'obscurine auparavant).

En 1955, Achmatowicz et Rodewald (1) attribuent à L 8, à l'acrifoline et l'annotinine, le caractère de bases tertiaires, puisqu'ils donnent avec l'iodure de méthyle des dérivés à I pentavalent.

En 1956, Wiesner, Valenta, Ayer et Bankiewicz (77) étudient la structure de l'annotinine au moyen d'esters nitrés et de lactones ; ils aboutissent à une formule comportant un noyau hexahydrojubolidine, avec une incertitude sur la localisation d'une liaison.

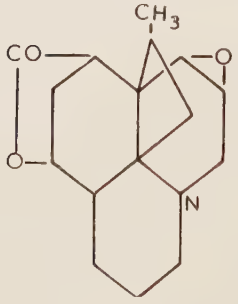
La même année, Perry et Mac Lean (70) étudient la structure de l'acrifoline (L 27 : $C_{16}H_{23}O_2N$), pour laquelle ils trouvent une double liaison, un CO et un OH.

Dans l'annotine (L 11 : $C_{16}H_{21}O_3N$), ils trouvent une double liaison, un CO, un OH et un O inerte, probablement fonction éther.

L 12, $C_{18}H_{25}O_3N$, se révèle être l'o-acétyl-acrifoline.

L 8, $C_{16}H_{25}O_2N$, montre la présence de CO et OH aux rayons I.R.

Ces quatre alcaloïdes ont le même tétracycle basique que la lycopodine et l'annotinine.




En 1957 (78) et 1958 (79), Wiesner, Valenta, Ayer, Fowler et Francis publient des articles faisant le point sur la structure de l'*annotinine*, dans lequel ils donnent le détail des procédés chimiques utilisés et qui confirme la structure indiquée précédemment approuvée par l'étude de la structure moléculaire du bromhydrate d'annotinine (Przybylska et Marion [71]) (cf. formule ci-contre).

La même année, Anet et Eves (6) fournissent sur la lycodine qu'ils viennent de découvrir les renseignements suivants : présence d'un chromophore pyridinique, d'un NH et d'un C-$CH_3$.

Nous avons signalé plus haut qu'en 1959 Anet et Khan (7) ont isolé quatre nouvelles bases. Sur celles-ci, ils fournissent les indications suivantes :

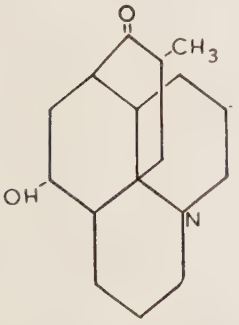
l'annofoline $C_{16}H_{25}O_2N$ contient les groupements CO et OH ;

la lycofoline $C_{16}H_{25}O_2N$ possède au moins un OH et peut-être une double liaison ;

l'α et β lofolines ($C_{18}H_{29}O_3N$) contiennent un OH et un O acétyl.

Ces quatre corps ont été étudiés par les spectres I.R.

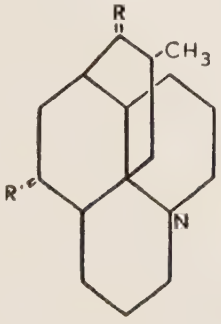
En 1960 (8), les mêmes auteurs publient sur la structure de l'*annofoline* à laquelle ils attribuent la formule suivante :




Ils indiquent également que les α et β lofolines sont des alcools épimères et que la β lofoline est identique à la fawcettiine $C_{18}H_{29}O_3N$ découverte par Burnell (23). Celui-ci confirme d'ailleurs leur opinion, puisque dans une publication (23) de la même année il montre que le perchlorate de β lofoline est identique à celui de la fawcettiine et que le mélange des deux ne donne pas de modification du point de fusion.

Dans une nouvelle publication (25), Burnell et Taylor continuent l'étude de la structure des différents alcaloïdes et concluent aux structures suivantes :

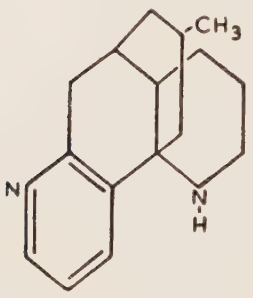
Structure générale :



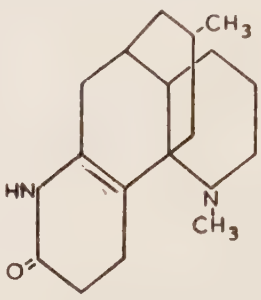

*Radicaux :*

| R | R' | Alcaloïde |
|---|---|---|
| =O | OH / H | annofoline |
| =O | $OCOCH_3$ / H | déhydrofawcettiine |
| OH / H | $OCOCH_3$ / H | fawcettiine |
| OH / H | OH / H | déacétylfawcettiine |
| $OCOCH_3$ / H | $OCOCH_3$ / H | base K |
| OH / H | =O | clavolonine (découvert dans *Lycopodium clavatum*, épimère de l'annofoline). |

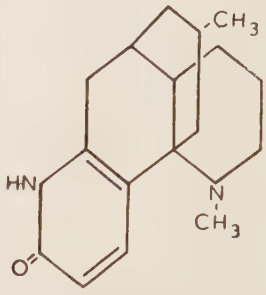
Cette même année, Ayer et Iverach (12) étudient la structure de la lycodine (nouvelle formule : $C_{16}H_{22}N_2$) et les α et β *obscurines*, et fournissent les formules suivantes :




lycodine



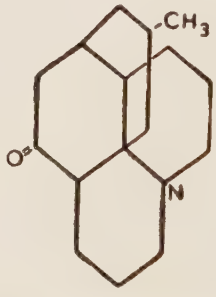

α obscurine



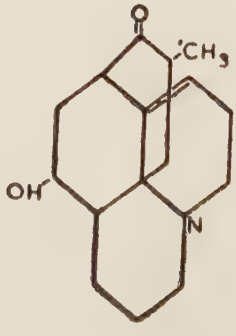

β obscurine

Leur étude est menée essentiellement au moyen des spectres U.V., I.R. et NMR, et ils concluent que l'α obscurine est identique à la dihydro- β obscurine.

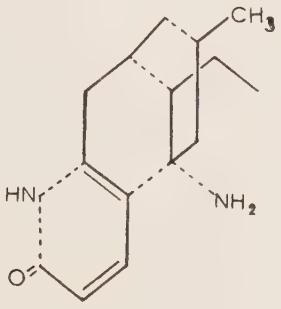
De leur côté Harrisson et Mac Lean (38) élucident la structure de la *lycopodine* pour laquelle ils donnent la formule développée suivante :




Mac Lean et French, toujours en 1960 (35) fournissent la structure détaillée de l'*acrifoline :*



Enfin, Valenta, Yoshimura, Roger, Ternbah et Wiesner (75) résolvent la structure de la *sélagine :*



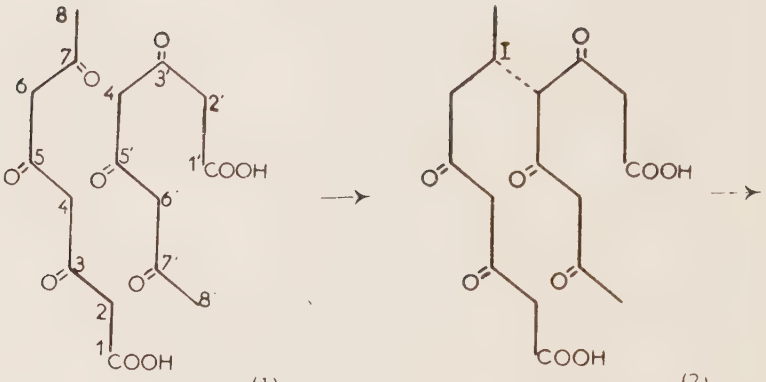

Cette étude est menée également au moyen des spectres et de l'oxydation de la sélagine avec examen des produits formés.

## 4° BIOGENESE DES ALCALOIDES DE LYCOPODE

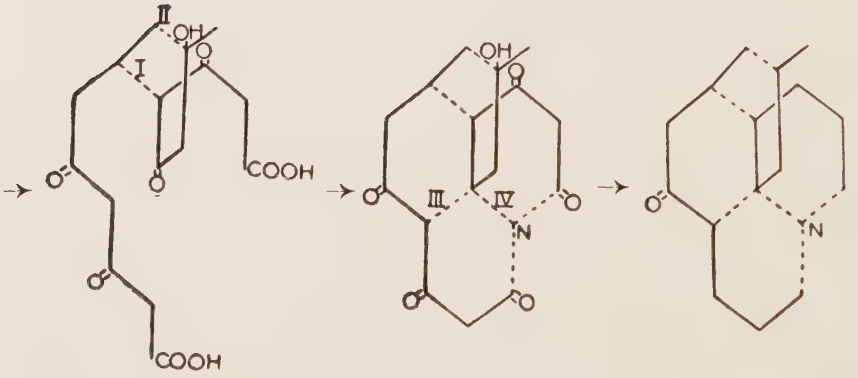
Conroy, en 1956, a émis l'hypothèse suivante : le noyau commun à la plupart des alcaloïdes de lycopode serait formé à partir de deux chaînes en C 8, elles-mêmes constituées au moyen de chaînons acétiques en C 2.

Il a repris et développé cette hypothèse dans une publication en 1960 (29), après l'élucidation des structures de la sélagine, de la lycopodine, des obscurines et de la lycodine (voir ci-dessus).

L'auteur part de deux chaînes semblables constituées chacune par un acide 3-5-7 tricéto-octanoïque (1). Une première condensation aldolique avec départ d'eau, entre le C 7 carbonyle et le C 4' méthylénique crée une première liaison (I) entre les deux chaînes (2). Elle est suivie d'une deuxième condensation entre les C 8 et C 7' (3) qui provoque la liaison (II). Ensuite, une condensation de Mannich (45) avec une molécule d'ammoniaque provoque la fermeture simultanée en III et IV (4) et fournit la lycopodine (5) après réduction des carbonyles restants.

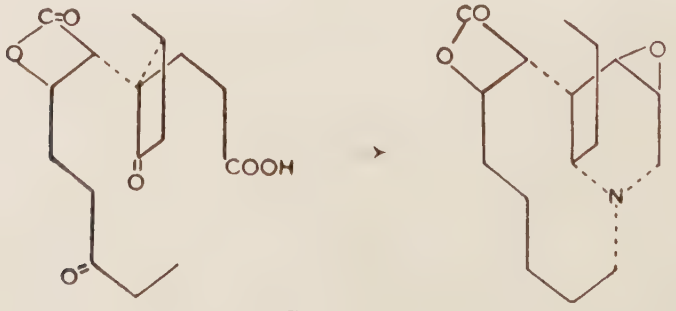


(1) (2)



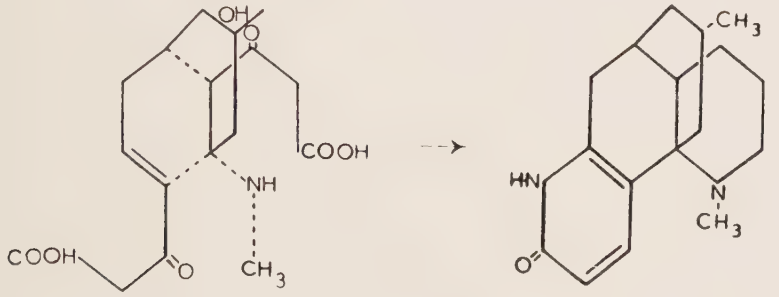
(3) (4) (5)

Pour l'annotinine, la fermeture II fournit un cycle butane, car elle ne peut se faire sur le C 8 oxydé. On obtient (6) et un processus semblable au précédent conduit à l'alcaloïde (7).

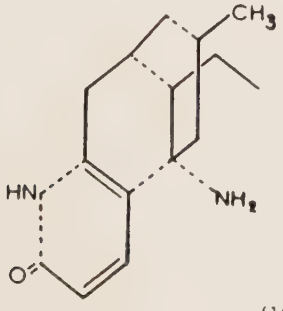


(6) (7)

Pour les obscurines, c'est au cours de la condensation en III et IV qu'une modification intervient : il y a méthylation de l'azote et un deuxième azote se fixe en C 5 à la place de l'oxygène (8). Il y a ensuite fermeture selon (V) (9), qui fournit la β obscurine.




(8) (9)




(10)

L'α obscurine est la dihydro- β obscurine.

La pyridine correspondant à cette pyridone est la lycodine.

Enfin, la sélagine a perdu un carbonyle en C 1' au départ, ce qui empêche la fermeture V qui se produit dans les obscurines (10).

Cette explication très seyante n'a pas reçu, à notre connaissance, de vérification expérimentale.

Pour conclure cette étude bibliographique, nous donnons ci-après un tableau des alcaloïdes de lycopodes dénombrés à ce jour, qui nous montre la complexité du problème. On peut évidemment se demander, d'une part, s'il n'y a pas identité de certains sous des dénominations différentes (on a déjà constaté que L 8 = L 30, β lofoline = fawcettiine, par exemple), d'autre part, si les procédés d'extraction ne produisent pas des transformations et remaniements dans la structure de ces alcaloïdes.

Quoiqu'il en soit, il semble bien qu'il y ait des modifications assez importantes suivant les espèces, avec cependant certains alcaloïdes que l'on retrouve à peu près dans toutes, comme la lycopodine.

TABLEAU N° I. — **ALCALOIDES DE LYCOPODES** d'après Boit (18)

| FORMULE | NOM | POINT de fusion de la base | POINT de fusion des sels | AUTEURS | ANNEE | ORIGINE |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $C_{10}$ $C_{10}H_{19}N$ | Saururine | | Picrate 202° | Deulofeu et de Langhe | 1942 | L. saururus |
| $C_{10}H_{19}$ ou $_{21}ON$ | | | Picrate 121° | Bertho et Stoll | 1952 | L. annotinum |
| $C_{11}$ $C_{11}H_{19}ON$ | L 18 | | Picrate 195° | Marion et Manske | 1944 | L. clavatum |
| $C_{13}$ $C_{13}H_{21}ON$ | L 21 | | Picrate 107° | Manske et Marion | 1946 | L. lucidulum |
| $C_{14}$ $C_{14}H_{21}ON$ | L 35 | 133° | | Manske | 1953 | L. densum |
| $C_{15}$ $C_{15}H_{24}ON_2$ | Pillijanine | | | Adrian | 1886 | L. saururus |
| $C_{15}H_{25}ON$ | L 26 | 171° | | Marion et Manske | 1946 | L. sabinæfolium |
| $C_{15}H_{18}ON_2$ | Selagine | 224/6° | | Valenta | 1960 | L. selago |
| $C_{16}$ $C_{16}H_{21}O_3N$ | L 11 (annotine) | 175/6° | | Manske et Marion | 1943 | L. annotinum |
| $C_{16}H_{21}O_3N$ | L 7 (annotinine) | 232° | | Manske et Marion | 1943 | L. annotinum |
| $C_{16}H_{21}O_3N$ | Base VIII | | | Achmatowicz et Rodewald | 1958 | L. annotinum |
| $C_{16}H_{22}N_2$ | Lycodine | | | Ayer et Iverach | 1960 | L. obscurum |
| $C_{16}H_{23}ON$ | Base IV | | | Achmatowicz et Rodewald | 1958 | L. annotinum |
| $C_{16}H_{23}ON$ | Fawcettidine | | Picrate 222° | Burnell | 1959 | L. fawcettii |
| $C_{16}H_{23}O_2N$ | Acrifoline | 103° | Perchlorate 266° | Manske et Marion | 1947 | L. annotinum vté acrifolium |
| $C_{16}H_{23}O_2N$ | L 29 | | Perchlorate 274° | Manske et Marion | 1947 | L. annotinum vté acrifolium |
| $C_{16}H_{23}O_2N$ | Base VI (L 29 ?) | | | Achmatowicz et Rodewald | 1958 | L. annotinum |

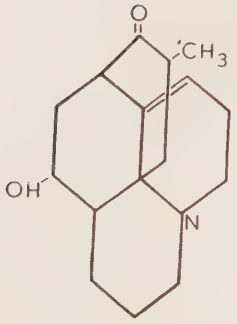
| FORMULE | NOM | POINT de fusion de la base | POINT de fusion des sels | AUTEURS | ANNEE | ORIGINE |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $C_{16}C_{16}H_{25}N$ | L 14 | | | Marion et Manske | 1944 | L. tristachyum |
| $C_{16}H_{25}ON$ | Lycopodine | 116° | Perchlorate 283° | Manske et Marion | 1942 | L. flabelliforme |
| $C_{16}H_{25}ON$ | Isolycopodine | 136° | Perchlorate 274° | Achmatowicz et Rodewald | 1955 | L. annotinum |
| $C_{16}H_{25}ON$ | L 13 | 130° | Perchlorate 274° | Marion et Manske | 1944 | L. clavatum |
| $C_{16}H_{25}ON$ | L 16 | | Perchlorate 221° | Manske et Marion | 1944 | L. obscurum vté dendroïdeum |
| $C_{16}H_{25}ON$ | L 24 | | Perchlorate 278° | Manske et Marion | 1946 | L. lucidulum |
| $C_{16}H_{25}ON$ ? | | | Perchlorate 234° | Bertho et Stoll | 1952 | L. annotinum |
| $C_{16}H_{25}O_2N$ | Lycofoline | 144/5° | | Anet et Khan | 1959 | L. annotinum |
| $C_{16}H_{25}O_2N$ | Annofoline | 156/7° | Perchlorate 234° | Anet et Khan | 1959 | L. annotinum |
| $C_{16}H_{25}O_2N$ | Clavolonine | 238° | | Burnell et Taylor | 1960 | L. clavatum |
| $C_{16}H_{25}O_2N$ | L 23 | 161/2° | Perchlorate 300° | Manske et Marion | 1946 | L. lucidulum |
| $C_{16}H_{25}O_2N$ | Pseudoselagine=L23? | 163° | Perchlorate 294° | Achmatowicz et Rodewald | 1956 | L. selago |
| $C_{16}H_{25}O_2N$ | L 8 = L 30 | 180° | Perchlorate 318° | Manske et Marion | 1943 | L. annotinum |
| $C_{16}H_{25}O_2N$ | Clavatine | 212/3° | | Achmatowicz et Uzieblo | 1938 | L. clavatum |
| $C_{16}H_{25}O_2N$ | L 34 | 236° | | Manske | 1953 | L. densum |
| $C_{16}H_{25}O_2N$ ? | L 9 | 122° | | Manske et Marion | 1943 | L. annotinum |
| $C_{16}H_{25}O_2N$ | L 25 | | Perchlorate 297° | Manske et Marion | 1946 | L. lucidulum |
| $C_{16}H_{26}ON_2$ | Cernuine | 106° | Perchlorate 110° | Manske et Marion | 1948 | L. cernuum |
| $C_{16}H_{27}N$ | L 4 | | Perchlorate 225° | Manske et Marion | 1942 | L. flabelliforme |
| $C_{16}H_{27}ON$ | L 10 | | Perchlorate 223° | Manske et Marion | 1943 | L. annotinum |

| FORMULE | NOM | POINT de fusion de la base | POINT de fusion des sels | AUTEURS | ANNEE | ORIGINE |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $C_{16}$ $C_{16}H_{27}ON$ | L 22 | 108° | Perchlorate 254° | Manske et Marion | 1946 | L. luciduium |
| $C_{16}H_{27}O_2N$ | Desacetyl-fawcetiine | 203/4° | Perchlorcte 224 | Burnell | 1959 | L. fawcettii |
| $C_{16}H_{27}O_2N$ | Base A | | Perchlorate 221° | Burnell | 1959 | L. fawcettii |
| $C_{17}$ $C_{17}H_{24}ON_2$ | β Obscurine | 321° | Perchlorate 322° | Manske et Marion | 1943 | L. annotinum |
| $C_{17}H_{25}O_2N$ | Base IX | | | Achmatowicz et Rodewald | 1958 | L. annotinum |
| $C_{17}H_{25}O_2N$ | Base E | | Perchl. 267/9° | Burnell | 1959 | L. fawcettii |
| $C_{17}H_{25}O_3N$ | Base X | | | Achmatowicz et Rodewald | 1958 | L. annotinum |
| $C_{17}H_{26}ON_2$ | α Obscurine | 283/4° | Perchlorate 255° | Manske et Marion | 1943 | L. annotinum |
| $C_{17}H_{26}ou_{24}ON_2$ | Sauroxine | 198° | | Deulofeu et de Langhe | 1942 | L. saururus |
| $C_{17}H_{27}O_2N$ | Clavatoxine | 185/6° | | Achmatowicz et Uzieblo | 1938 | L. clavatum |
| $C_{17}H_{27}O_2N$ | L 20 | 259° | Perchlorate 271° | Manske et Marion | 1946 | L. lucidulum |
| $C_{17}H_{27}O_2N$ | L 28 | | Perchlorate 211° | Manske et Marion | 1947 | L. annotinum vté acrifolium |
| $C_{17}H_{27}O_2N$ | Base V = L 28 ? | | | Achmatowicz et Rodewald | 1958 | L. annotinum |
| $C_{17}H_{27}O_2N$ | Base M | | Perchlorate 280° | Burnell | 1960 | L. fawcettii |
| $C_{18}$ $C_{18}H_{25}O_3N$ | L 12 (acetylacrifoline) | 119/21° | Perchlorate 244° | Manske et Marion | 1943 | L. annotinum |
| $C_{18}H_{25}O_3N$ | Base XI | | | Achmatowicz et Rodewald | 1958 | L. annotinum |
| $C_{18}H_{25}O_4N$ | Base XII | | | Achmatowicz et Rodewald | 1958 | L. annotinum |
| $C_{18}H_{27}O_3N$ | L 17 | | Perchlorate 296° | Manske et Marion | 1944 | L. obscurum vté dendroïdeum |

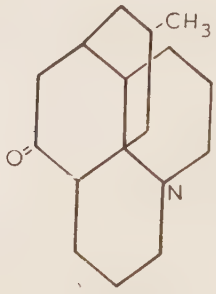
| FORMULE | NOM | POINT de fusion de la base | POINT de fusion des sels | AUTEURS | ANNEE | ORIGINE |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $C_{18}$ $C_{18}H_{27}O_3N$ | Base G | | Perchl. 198/200° | Burnell | 1959 | L. fawcettii |
| $C_{18}H_{28}O_2N_2$ | L 5 | | Perchlorate 282° | Manske et Marion | 1942 | L. flabelliforme |
| $C_{18}H_{29}O_2N$ | L 2 (acetyl-dihydro-lycopodine) | 97° | Perchlorate 246° | Manske et Marion | 1942 | L. flabelliforme |
| $C_{18}H_{29}O_3N$ | Fawcettiine | | Perchlorate 272° | Burnell | 1959 | L. fawcettii |
| $C_{18}H_{29}O_3N$ | β Lofoline = fawcettiine | 166/7° | | Anet et Khan | 1959 | L. annotinum |
| $C_{18}H_{29}O_3N$ | α Lofoline | 211/2° | | Anet et Khan | 1959 | L. annotinum |
| $C_{18}H_{31}O_3N$ | L 1 (complanatine) | 169° | Perchlorate 194° | Manske et Marion | 1942 | L. flabelliforme |
| $C_{18}H_{31}O_2N$ | L 3 | | Perchlorate 246° | Manske et Marion | 1942 | L. flabelliforme |
| $C_{20}$ $C_{20}H_{29}O_4N$ | L 31 | | Perchlorate 217° | Manske et Marion | 1947 | L. annotinum vté acrifolium |
| $C_{20}H_{29}O_4N$ | Base VII = L 31 ? | | | Achmatowicz et Rodewald | 1958 | L. annotinum |
| $C_{20}H_{29}O_4N$ | Base N (diacetyllycofoline) | 140° | | Burnell | 1960 | L. fawcettii |
| $C_{20}H_{31}O_4N$ | L 15 | | Perchlorate 231° | Marion et Manske | 1944 | L. tristachyum |
| $C_{20}H_{31}O_4N$ | L 33 | | | Marion et Manske | 1948 | L. cernuum |
| $C_{20}H_{31}O_4N$ | L 19 | | | Marion et Manske | 1944 | L. clavatum |
| $C_{20}H_{31}O_4N$ | Base K (acetylfawcettiine) | | Perchlorate 117° | Burnell | 1960 | L. fawcettii |
| $C_{20}H_{31}O_5N$ | Base O | 181° | | Burnell | 1960 | L. fawcettii |

TABLEAU N° II

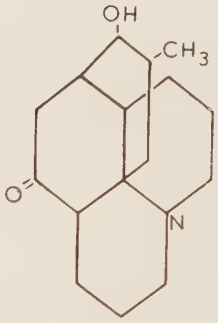
## PRINCIPAUX ALCALOIDES DE LYCOPODE DE STRUCTURE ELUCIDEE



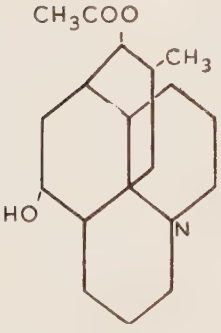

acrifoline



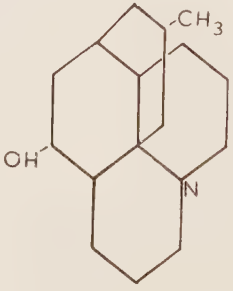

lycopodine



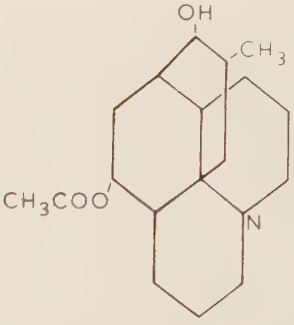

clavolonine



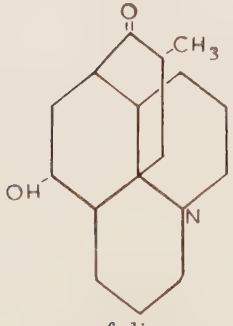

α lofoline



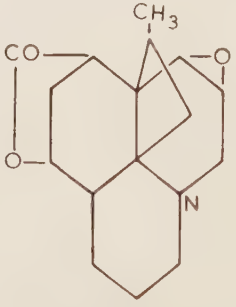

dihydrolycopodine



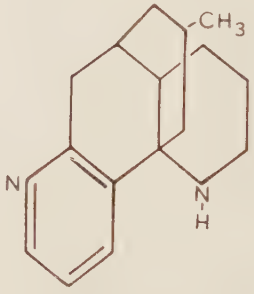

β lofoline
(fawcettiine)



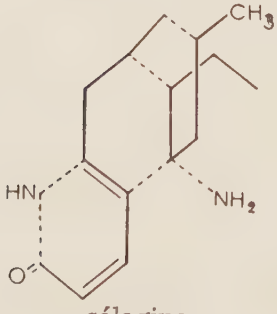

annofoline



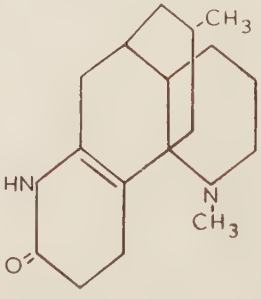

annotinine



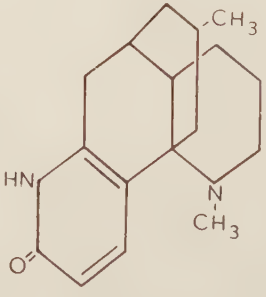

lycodine




sélagine




α obscurine




β obscurine

# TRAVAUX PERSONNELS

## I. - PROCÉDÉS D'EXTRACTION ET EXAMENS PRÉLIMINAIRES

### A. — PREPARATION DU MATERIEL.

La drogue nous a été adressée de la République Malgache par avion, emballée dans des couffins. Mais le ramassage lui-même, assez difficile, nécessitait un certain temps, par suite de longs déplacements dans l'Ile, ce qui explique que le matériel n'a pu arriver toujours très frais ; il était parfois à demi-séché.

Nous avons disposé, pour la totalité de notre étude, d'une quarantaine de kilos de plante fraîche ou à demi-sèche, qui nous ont fourni environ 6 kg 500 de drogue sèche. Plus de la moitié a été réservée à l'expérimentation animale.

Trois traitements ont été appliqués concurremment :

1° Simple dessication de la plante à température voisine de 25° ;

2° Stabilisation selon la méthode de Perrot et Goris (36) suivie de dessication à l'air ;

3° Stabilisation selon la technique de Bourquelot (20) (appliquée au matériel reçu dans l'état de fraîcheur le plus grand).

Dans les deux premiers cas, la plante entière, comprenant tige, racines et feuilles ainsi que les épis sporangifères s'il y avait lieu, a été réduite à l'état de poudre moyenne avant dessication complète (les tiges ligneuses séchées, extrêmement dures, sont en effet très difficiles à broyer) et séchée ensuite à l'étuve à température inférieure à 40°.

### B. — EXTRACTION DES ALCALOIDES.

Nous nous sommes essentiellement attachés à l'étude des principes actifs alcaloïdiques et nous avons recherché une méthode d'extraction s'adaptant spécialement à ceux-ci.

Sur une première partie de la drogue, nous avons effectué une humidification de la poudre par une solution de carbonate de

sodium neutre à 10 % (selon la technique décrite par Paris et Goutarel) (66), suivie d'une filtration sur entonnoir Büchner et d'une extraction au chloroforme pratiquée sur le filtrat, ainsi que sur la poudre, celle-ci étant ensuite extraite à l'éther, puis au méthanol, au Soxhlet. Après réunion des différents extraits et purification par passage en milieu aqueux acide (HCl à 5 %) suivi d'une nouvelle extraction chloroformique en milieu alcalin, nous avons obtenu 0,1 % à 0,25 % (suivant les échantillons) d'un résidu brunâtre, d'aspect cireux, qui contenait les alcaloïdes totaux de la drogue.

A titre d'exemple, les pourcentages d'alcaloïdes isolés de diverses espèces de lycopodes sont les suivants :

*Lycopodium inundatum* 0,40 à 0,45 %
*Lycopodium complanatum* 0,20 à 0,30 % ;
*Lycopodium clavatum* 0,20 % ;
*Lycopodium selago* 1 % ;
*Lycopodium annotinum* 1 %

Nous avons ensuite appliqué une méthode plus adaptée au traitement de quantités relativement importantes de produit.

Il s'agit d'une lixiviation par l'alcool à 70° au moyen d'un percolateur. La poudre est mise à macérer 24 heures avant le début de la percolation qui s'effectue au goutte à goutte, avec un poids d'alcool 10 fois plus important que le poids de poudre sèche. La teinture recueillie est ensuite concentrée à l'évaporateur rotatif sous vide, jusqu'à élimination de l'alcool et d'une notable partie de l'eau (de façon à revenir au poids de drogue sèche utilisée). Les particules solides en suspension (comprenant notamment la chlorophylle) sont éliminées par filtration sur Büchner et l'on traite la teinture par le chloroforme, après l'avoir alcalinisée par l'ammoniaque. A la solution chloroformique est ensuite ajouté l'acide chlorhydrique dilué qui extrait les alcaloïdes sous forme de chlorhydrates. Une nouvelle extraction chloroformique en milieu alcalin fournira le bloc alcaloïdique.

La partie solide restée sur le filtre est également remise à macérer dans l'acide chlorhydrique à 5 % et traitée comme précédemment.

Nous avons obtenu un rendement en alcaloïdes à peu près égal à celui fourni par le procédé précédent. Comme nous avions constaté que la solubilité des alcaloïdes de *Lycopodium phlegmaria* L. est bien plus grande dans le chloroforme et l'alcool que dans l'éther, il s'est révélé inutile de réaliser une extraction éthérée supplémentaire.

Ce procédé d'extraction présente en outre l'avantage de permettre l'étude des autres constituants chimiques de la drogue,

étude que nous n'avons fait qu'effleurer, mais qui nous a cependant fourni quelques remarques intéressantes.

## C. — ETUDE DES SUCRES ET DES ACIDES AMINES.

Nous avons effectué un examen rapide de la teinture alcoolique après élimination de l'alcool et extraction alcaloïdique.

**Défécation :**

La solution aqueuse restante a été traitée par l'acétate neutre de Pb à 10 % à *p*H neutre. Après un repos d'un quart d'heure et filtration, l'acétate de plomb en excès a été précipité par une solution saturée de phosphate disodique. Une nouvelle filtration nous a fourni une liqueur déféquée limpide.

**Séparation sur échangeurs d'ions**

La liqueur a été versée sur une colonne de permutite qui retient les acides aminés, élués ensuite par de l'ammoniaque 2N. La fraction non retenue de la liqueur primitive est ensuite passée sur une colonne de déacidite qui retient les acides organiques : l'éluat contient les sucres.

Nous avons ainsi recueilli séparément sucres, acides aminés et acides organiques. Nous avons seulement examiné sommairement les deux premiers.

**Examen chromatographique des sucres :**

Une chromatographie sur papier en milieu butanol acétique nous a donné les résultats suivants : présence d'un spot net au niveau du glucose et de deux autres spots plus faibles de $R_G$ (*) 0,77 et 1,17 dont la position fait penser au fructose et au saccharose. Il est donc probable que ces trois sucres sont présents dans la plante.

**Examen chromatographique des acides aminés :**

Nous avons utilisé la technique de Boulanger et collaborateurs (19) ainsi que la méthode d'électrochromatographie mise au point par les mêmes chercheurs.

Les acides aminés suivants ont été identifiés :

acide aspartique, glutamique, sérine, glycocolle, thréonine, alanine et β alanine, proline, acide α amino butyrique, valine, méthionine, leucine et isoleucine, phényl-alanine, tyrosine, ainsi que, en assez forte proportion, lysine, arginine, histidine.

---

(*) $RG = \dfrac{\text{distance de déplacement du glucide considéré}}{\text{distance de déplacement du glucose}}$

En outre, une tache inconnue a été révélée, qui, après isolement par électrophorèse sur poudre de cellulose (technique de Montant [59]) s'est montrée stable à l'hydrolyse acide (HCl 6N, 24 h. à 110° en tube scellé) ce qui exclut une nature peptidique.

Par son comportement en chromatographie et électrochromatographie, ce corps inconnu se rapprocherait de l'acide méthyl-hydroxy-glutamique signalé par Virtanen et Berg (76) dans *Phillitis Scolopendrium* et Steward (37) dans *Adiantum pedatum* ; ces deux végétaux appartiennent à la famille des Polypodiacées. Il serait intéressant de vérifier l'hypothèse d'une identité de cet acide aminé avec l'acide méthyl-hydroxy-glutamique. Nous n'avons pas pu le faire encore faute de témoin à incorporer dans nos chromatogrammes.

## D. — RECHERCHE DE PRINCIPES HETEROSIDIQUES.

Notre attention ayant été attirée sur les propriétés laxatives de la drogue, nous avons songé à rechercher des principes hétérosidiques.

Nous avons appliqué la réaction de Borntraeger pour l'identification des hétérosides anthraquinoniques (addition d'ammoniaque à l'extrait éthéré). Elle s'est révélé négative.

Par contre, l'action de l'acide sulfurique pur sur cet extrait éthéré évaporé développe une coloration rouge-violet très vive que Brunel (21) indique comme réaction des saponosides. Cette coloration apparaît d'ailleurs sur la poudre végétale, mais plus lentement (elle passe progressivement du rouge au violet), et non sur le bloc alcaloïdique.

La chromatographie dans le butanol acétique du même extrait éthéré montre trois taches fluorescentes aux rayons ultra-violets : deux taches bleues de $R_F$ 0,65/0,70 et 0,15/0,20, une troisième jaunâtre sur la ligne de départ.

Cet extrait éthéré évaporé se décompose en deux parties : une masse cireuse, filante, brunâtre, soluble dans l'alcool, et un dépôt d'aspect gélatineux, presque blanc, soluble dans l'eau.

La première substance a été essayée sur le cœur de grenouille et s'est montrée légèrement active, mais il est difficile de savoir si cette activité lui est propre, ou si elle est due à des traces légères d'alcaloïdes qui auraient pu rester fixées sur elle.

## E. — RECHERCHE DE LA NICOTINE.

La nicotine ayant été trouvée dans plusieurs espèces de Lycopodes, il nous a paru nécessaire de rechercher si nous pouvions la mettre en évidence dans *Lycopodium phlegmaria* L.

Mettant à profit la propriété de la nicotine d'être un alcaloïde très volatil, qui passe dans la distillation lorsqu'on fait bouillir une solution aqueuse de celle-ci, nous avons effectué la distillation d'un infusé de *Lycopodium phlegmaria* L. et nous avons comparé ce distillat avec celui d'une solution de nicotine.

Nous avons bien constaté dans le distillat de notre infusé de légères traces d'alcaloïdes, mais une chromatographie comparative des deux distillats concentrés n'a pas montré les mêmes $R_F$. Le distillat de l'infusé possède deux taches de $R_F$ 0,30/0,50 environ. La nicotine a un comportement chromatographique assez irrégulier mais sa tache ne s'aligne pas sur les précédentes et sa coloration au réactif de Dragendorff est beaucoup plus rouge.

D'autre part, nous avons fait appel à une réaction colorée très sensible utilisée en toxicologie pour détecter les traces de nicotine dans l'air (44) et qui est la méthode de Koenig : à 5 ml de solution aqueuse de nicotine, neutralisée par l'acide acétique, on ajoute 1 ml de solution de bromure de cyanogène (préparée par action d'une solution de cyanure de potassium à 1/10 sur de l'eau de brome, jusqu'à décoloration) et on porte deux minutes au bain-marie à 80°. Puis, on verse 3 ml de solution de benzidine à 1 % en milieu acétique et 2 ml d'acide acétique à 1/2. Une coloration orangée très nette se développe, comme nous l'avons vérifié avec une solution de nicotine. Avec le distillat de l'infusé de *Lycopodium phlegmaria* L., nous n'avons pas eu de coloration nette.

Il semble donc que l'on puisse affirmer qu'il n'y a pas de nicotine dans *Lycopodium phlegmaria* L., ou que, s'il en existe, c'est à l'état de très faibles traces que nous n'avons pu déceler faute de quantité suffisante de drogue au départ.

# II. - ETUDE DES ALCALOIDES

C'est à l'étude des alcaloïdes de la drogue, qui en représentent le principe le plus actif, que nous avons consacré la presque totalité de notre expérimentation chimique.

Elle se décompose en trois phases :

1° Une phase d'exploration, faisant essentiellement appel à la chromatographie et à l'électrophorèse sur papier, qui nous a permis d'acquérir des notions sur le nombre des alcaloïdes de la plante et sur les moyens de les séparer ;

2° Une phase de séparation des différents alcaloïdes, pour laquelle nous avons utilisé concurremment la chromatographie sur colonne et le procédé de contre-courant ;

3° Une phase d'étude de la nature des alcaloïdes, menée au moyen de la spectographie I.R. et U.V. et par comparaison avec des alcaloïdes de référence, de structure connue, déjà trouvés dans d'autres lycopodes.

## 1° ESSAIS SUR LE BLOC ALCALOIDIQUE

### A. — EXAMEN PRELIMINAIRE

**1. — Réactions colorées particulières des alcaloïdes de Lycopode.**

Nous avons effectué un certain nombre de réactions sur le bloc alcaloïdique total.

Celui-ci, mis en solution dans l'acide chlorhydrique dilué à 5 %, ne donne pas de coloration par addition de chlorure ferrique.

L'action de l'acide azotique ne développe aucune coloration, même après addition de soude alcoolique.

L'acide sulfurique seul ne produit rien, mais si l'on ajoute quelques gouttes d'eau de brome, un précipité jaune clair se forme et se dépose au fond du tube. L'addition d'ammoniaque redissout le précipité sans donner de coloration.

Le réactif de Marquis ne développe aucune coloration. Si l'on ajoute de l'acide nitrique, il se développe une coloration verte.

L'acide sulfurique, accompagné de bichromate de potassium, donne également naissance à une coloration verte qui se développe lentement, mais devient très vive au bout de quelques minutes.

L'acide sulfurique avec le molybdate d'ammonium donne une coloration bleue très nette qui se développe lentement (réaction également positive avec la morphine) et qui indique un caractère réducteur.

**2. — Essais de purification du bloc alcaloïdique.**

L'aspect vernissé, brillant, fortement coloré en brun du bloc alcaloïdique fait tout naturellement penser à la présence de cires dans celui-ci. Ceci peut être mis en parallèle avec la présence d'un revêtement vernissé sur les feuilles et tiges des lycopodes.

D'ailleurs, dans la purification par contre-courant (que nous effectuerons ensuite) le premier tube, après épuisement des alcaloïdes, contient une substance fortement colorée en brun rouge, dont les taches sur le papier ne se mouillent pas facilement et qui émet une fluorescence jaunâtre aux rayons U.V.

Nous avons essayé d'effectuer une hydrolyse acide du bloc alcaloïdique pour voir si nous pouvions isoler d'autres constituants (glucides entre autres).

a) *Une hydrolyse de* 30 *minutes* nous donne les résultats suivants : la fraction aqueuse de l'hydrolysat émet une fluorescence jaune aux U.V. Un dépôt effectué sur papier se colore en brun par l'ammoniaque. Les colorations par la ninhydrine et le réactif de Partridge apparaissent négatives, mais il est difficile de se prononcer étant donnée la coloration brune de la tache avant la réaction.

b) *Une hydrolyse de* 24 *heures* semble donner une coloration légèrement positive pour le réactif de Partridge et la ninhydrine fournit une auréole rose vif, différente de la tache violette fournie par les acides aminés.

**3. — Essai d'acétylation des alcaloïdes.**

Nous avons constaté, en effectuant l'acétylation du bloc alcaloïdique au moyen de l'anhydride acétique, que les substances obtenues avaient un $R_F$ augmenté par rapport aux alcaloïdes non traités. En effet, nous avons obtenu en général trois taches principales (dans le butanol acétique) de $R_F$ : 0,30, 0,40 à 0,50, 0,80 à 0,90 correspondant aux trois taches de $R_F$ : 0,15, 0,30, 0,60 obtenues avec les alcaloïdes non traités.

**4. — Essais de séparation par voie chimique.**

Nous avons voulu utiliser les différences de solubilité des alcaloïdes et de leurs sels (bromhydrates) pour les séparer.

Après dissolution dans l'acétone à ébullition, nous avons fait agir l'acide bromhydrique qui nous a fourni un précipité. Ce précipité repris par le chloroforme contenait des alcaloïdes, la solution restante également. Mais l'analyse chromatographique nous a montré que le contenu alcaloïdique des deux était à peu près semblable et complexe dans les deux cas. Il n'y a pas eu de bonne séparation.

## B. — CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DE L'EXTRAIT CHLOROFORMIQUE

**Historique :**

Depuis Machebœuf, Munier et leurs collaborateurs (61), la chromatographie de partage sur papier des alcaloïdes a été réalisée de différentes façons : ils ont établi les meilleures conditions pour réaliser la chromatographie sur papier salé en phase solvante acide, ce qui élimine les queues de spots et supprime la démixion. Carless et Woodhead (27) ont, les premiers, introduit des papiers tamponnés à pH déterminé avec phase mobile neutre, suivis en cela par Buchi et Schumacher (22) (*Etude des alcaloïdes de Solanacées, des feuilles de Coca, de l'opium, des Strychnos, des Hydrastis et de l'Ipéca*). Thomas et Roland (74) ont également étudié ce procédé, le papier étant imprégné de phosphate monopotassique ; ils emploient pour solvant du n-butanol saturé d'eau.

Signalons enfin l'emploi par certains auteurs de la chromatographie sur papier imprégné de solvant polaire (formamide, propylène-glycol, octanol) avec pour solvant un solvant peu polaire : éther de pétrole, cyclohexane, benzène, chloroforme (Zaffaroni et collaborateurs) (80).

**Technique :**

a) *Papier.* — Celui qui nous a donné les meilleurs résultats est le papier Arches 302. Toutefois, s'il est utilisé sans traitement particulier, les alcaloïdes produisent des traînées qui peuvent gêner la localisation des taches.

Nous avons essayé des papiers imprégnés de différentes solutions salines et avons adopté le papier trempé dans une solution de phosphate monopotassique à 50 g par litre et séché ensuite à 80° à l'étuve.

b) *Solvant.* — Nous avons utilisé concurremment soit le butanol saturé d'eau, soit le butanol acétique, selon la formule de PARTRIDGE (69) : 40 ml de n-butanol,
10 ml d'acide acétique,
50 ml d'eau distillée.

Les résultats sont bons dans les deux cas ; les $R_F$ diffèrent notablement. La chromatographie comparative dans les deux milieux a permis d'éviter certaines confusions dues à la proximité des $R_F$ d'alcaloïdes différents.

c) *Procédé chromatographique.* — Les deux procédés les plus classiques : chromatographie ascendante ou descendante ont été utilisés et fournissent des résultats comparables. Pour des raisons pratiques, nous avons retenu surtout la chromatographie descendante, effectuée en cuve Shandon dans une enceinte climatisée (température voisine de 20°). Le front du solvant a été toujours arrêté à dix-huit centimètres de la ligne de départ et il faut en moyenne 6 à 7 heures pour obtenir ce développement.

d) *Révélation.* — Lorsque la migration atteinte est obtenue, le papier est retiré de la cuve, égoutté, séché à l'étuve à chromatographie et révélé par le réactif de Dragendorff modifié (62).

**Résultats :**

La chromatographie de l'extrait chloroformique total nous a fourni en général trois spots de $R_F$ O,06 à 0,08, 0,16 à 0,20 et 0,35 à 0,40 dans le butanol aqueux.

L'extrait éthéré et l'extrait alcoolique fournissent des résultats semblables. Il apparaît cependant, avec des quantités plus importantes appliquées sur la ligne de départ, des spots supplémentaires, plus légers, vers 0,30 et 0,55/0,60.

D'autre part, dans la zone 0,16/0,20 il semble qu'il y a parfois un dédoublement en deux spots (0,18/0,22 et 0,19/0,21), ce qui indiquerait une richesse numérique importante en alcaloïdes (confirmée plus tard).

Cependant, la séparation des différents spots n'est pas très nette, il y a des traînées entre ceux-ci. La première conclusion à tirer est la présence de plusieurs alcaloïdes, trois au minimum et probablement six, de $R_F$ parfois voisins.

## C. — ELECTROPHORESE SUR PAPIER DE L'EXTRAIT CHLOROFORMIQUE

Un certain nombre de chercheurs ont déjà utilisé la technique de l'électrophorèse sur papier pour séparer des alcaloïdes. Citons en particulier FAUGERAS, qui a étudié les alcaloïdes des Genis-

tées (34), Paris et Faugeras, qui ont étudié les alcaloïdes de Légumineuses (67) et de Solanacées (68).

**Technique :**

Les auteurs précédents ont utilisé des milieux d'électrolytes différents, soit alcalins, soit acides. Nous avons nous-mêmes essayés trois types de solution : en milieu fortement alcalin, l'ammoniaque à 10 % (pH 12) ; en milieu légèrement alcalin, la solution véronal/véronal sodique (pH 8,6) ; en milieu acide, l'acide acétique à 6 % (pH 3).

C'est le bain acide qui s'est révélé le meilleur, avec un voltage de l'ordre de 600 volts. Avec le papier Arches 302, nous avions une intensité de l'ordre de 10 mA. La durée de passage du courant était fixée à 45 minutes. Le dépôt de l'extrait était effectué à 2 cm du milieu du papier, du côté du pôle positif.

**Résultats :**

Nous avons obtenu, à partir de l'extrait total chloroformique une séparation en deux fractions migrant toutes deux vers l'anode, la plus lente étant la plus importante.

## D. — ELECTROCHROMATOGRAPHIE

Après électrophorèse dans les conditions précédentes, le papier séché a été trempé dans une solution de phosphate monopotassique et séché de nouveau. Puis, il a été chromatographié dans le sens perpendiculaire (solvant : butanol aqueux).

L'électrochromatographie nous montre que la fraction la plus lente à l'électrophorèse se divise elle-même en deux, de $R_F$ respectifs 0,15 et 0,20, la plus rapide fournissant une seule tache de $R_F$ 0,06 environ. Nous retrouvons ici les trois principales taches indiquées par la chromatographie sur papier. Les alcaloïdes moins importants en quantité n'ont pas apparu sur ces chromatogrammes, les prises d'essai au départ étant probablement trop faibles.

Les résultats fournis par l'électrochromatographie ont été recoupés par une autre méthode : après électrophorèse, nous avons découpé les zones correspondant aux taches et nous avons extrait les alcaloïdes par macération dans une solution acide diluée, puis extraction chloroformique en milieu ammoniacal et nous avons rechromatographié les alcaloïdes isolés. Nous avons obtenu les mêmes résultats.

## 2° FRACTIONNEMENT DES ALCALOIDES

### A. — PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

Depuis Tswett, qui en a été le précurseur, la chromatographie sur colonne a été utilisée par de nombreux chercheurs pour la séparation de produits biologiques. Citons entre autres Kuhn, Reichstein, Tiselius qui définissent l'analyse frontale et l'analyse par déplacement.

Dans le domaine des alcaloïdes, Fried et coll., Adams et Govindachari (4), ont utilisé la chromatographie sur colonne d'alumine ; Karrer et coll. (11), qui ont travaillé sur les alcaloïdes des curares et des Strychnos, ont préféré la chromatographie sur cellulose, alors que Parks et coll. (39) choisissaient la chromatographie sur acide silicique.

Quelquefois également, il a été fait appel à la chromatographie sur échangeurs d'ions. Citons Applezweig (9) qui a utilisé les échangeurs de cations pour l'étude des alcaloïdes du quinquina et des Solanacées.

Nous avons retenu pour notre étude le procédé le plus fréquemment utilisé : chromatographie d'absorption sur alumine, avec analyse par éluants successifs.

**Principe :**

Le mélange à analyser est versé au sommet de la colonne et l'on fait agir ensuite une série de solvants de pouvoir éluant croissant, qui déplacent les substances absorbées, en commençant par celles qui sont le moins fixées sur l'absorbant. Le produit d'élution est recueilli par fractions successives.

**Technique :**

a) *Absorbant:* — Nous avons utilisé l'alumine Prolabo pour chromatographie, sans neutralisation préalable. Les dimensions de la colonne (partie remplie d'alumine) étaient : 150 mm de haut, 18 mm de diamètre.

b) *Solvants.* — Les systèmes d'éluants sont, soit le chloroforme et les mélanges chloroforme/méthanol, soit la série de Reichstein : éther de pétrole, benzène, éther éthylique, chloroforme, acétone, méthanol, plus ou moins modifiée. Fréquemment on supprime le chloroforme et l'acétone (43). C'est cette gamme de solvants que nous avons choisie, réduite au benzène, à l'éther éthylique et au méthanol, mais comprenant des mélanges en proportion différente de ces trois solvants.

L'élution est réalisée de façon continue et les éluats recueillis séparément par fractions de 10 ml. Le passage des alcaloïdes dans les fractions est repéré par le dépôt de spots sur papier et leur révélation avec le réactif de Dragendorff. Les différentes fractions sont ensuite chromatographiées sur papier phosphaté dans le butanol.

**Résultats :**

Une première chromatographie effectuée avec la gamme de solvants : éther de pétrole, éther de pétrole/benzène 1/1, benzène, benzène/éther éthylique 1/1, éther éthylique, éther/méthanol 95/5, éther/méthanol 2/1, méthanol, nous a montré que :

1° les alcaloïdes ne commencent à passer que dans les mélanges benzène/éther ;

2° dans chacune des fractions suivantes, il passe deux ou plusieurs alcaloïdes, avec souvent prédominance de l'un d'eux, jusqu'à la fraction éther + 5 % méthanol. Au-delà, il n'y a plus que des traces.

Nous nous sommes alors attachés à reprendre les différentes fractions de cette chromatographie qui paraissaient les plus intéressantes.

Tout d'abord, nous avons rechromatographié la fraction benzène/éther 1/1 avec la gamme des solvants : benzène/éther 99/1, 49/1, 19/1, 4/1, 7/3 et 1/1 et nous sommes arrivés à isoler de certaines fractions un alcaloïde unique, appelé par nous alcaloïde A, nettement caractérisé par son $R_F$ presque identique dans le butanol aqueux et dans le butanol acétique (0,60 à 0,70). Cet alcaloïde, dans certaines fractions, était accompagné de deux autres en plus faibles quantités, que nous n'avons pu séparer.

Ensuite, nous avons rechromatographié la fraction éther + 5 % de méthanol de la première chromatographie, avec la gamme suivante : éther pur, éther/méthanol 99/1, 98/2, 97/3, et 95/5. De légères traces d'alcaloïdes sont passées dans l'éther pur et dans la fraction éther/méthanol 99/1, mais la plus grande quantité est passée dans 95/5 et le contrôle chromatographique sur papier nous a montré qu'il s'agissait d'un alcaloïde unique, nettement caractérisé par son $R_F$ (0,15 à 0,20 dans le butanol aqueux, 0,45 à 0,50 dans le butanol acétique) que nous avons appelé alcaloïde B.

Enfin, de la fraction éther pur de la première chromatographie, nous avons retiré, après purification, un troisième alcaloïde de $R_F$ 0,35 à 0,40 dans le butanol aqueux, et 0,60 à 0,65 dans le butanol acétique, que nous avons appelé alcaloïde C.

Par ce procédé, nous avons ainsi réussi à séparer trois alcaloïdes différents nettement caractérisés par leurs $R_F$. Mais il y en avait d'autres que nous n'avons pu isoler.

Nous avons songé alors à utiliser le procédé de séparation par contre-courant, mis au point par Craig (30).

## B. — FRACTIONNEMENT DES ALCALOIDES PAR LE PROCEDE DE CONTRE-COURANT

Cette méthode a déjà été appliquée assez largement en chimie biologique, que ce soit dans le domaine végétal ou animal. Son application récente à l'étude des alcaloïdes de *Lycopodium annotinum* a été réalisée par Anet et Khan (7).

**Principe :**

Ce procédé consiste à agiter dans un tube le mélange à analyser avec deux solvants différents non miscibles, judicieusement choisis, et à laisser décanter. La phase la plus légère est ensuite transvasée dans un autre tube au contact d'une phase lourde pure, et remplacée par une autre portion également pure de cette même phase. L'opération est répétée un certain nombre de fois, et s'effectue automatiquement par le moyen d'un appareil.

Le coefficient de partage entre les deux solvants, pour une substance pure, à une température donnée, est égal à :

$$(1)\quad K = \frac{Y \text{ (concentration dans couche supérieure)}}{X \text{ (concentration dans couche inférieure)}}$$

Or, $Y + X = 1$ si nous choisissons une quantité de matière égale à l'unité, et $Y = KX$ d'après (1).

Dans le tube de départ n° 0, nous avons : $X = \frac{1}{K+1}$ et $Y = \frac{K}{K+1}$

Un calcul simple démontre que la concentration dans les différents tubes est fournie par la formule du binôme :

$$(X+Y)^n = X^n + n\,X^{n-1}\,Y + \ldots$$
$$\ldots + \frac{n\,(n-1)\,(n-2)\ldots(n-p+1)}{1.2.3.\ldots p}\,X^{n-p}Y^p + Y^n$$

Pour le tube de rang p, par exemple, nous aurons :

$$T_{(np)} = \frac{n!}{p!\,n\text{-}p!}\qquad \left(\frac{1}{K+1}\right)^n K^p$$

Les concentrations des tubes se répartissent de part et d'autre d'une concentration maximum selon la courbe de Gauss, le numéro du tube correspondant étant donné par la formule $N = n\left(\frac{K}{K+1}\right)$ qui permet de calculer le coefficient de partage K, si n est grand et K peu différent de 1 .

On peut utiliser également la formule de Karlson et Hecker (42) qui fournit K :

$$K = (p + 0{,}5)\frac{1}{n - p + 0{,}5}$$

(p = n° du tube de concentration maximum, n = nombre total de transferts).

*Choix des solvants* — Nous avons fixé notre choix, en nous inspirant de Anet et Khan (7), d'une part, sur le chloroforme et, d'autre part, sur une solution de phosphate monopotassique et disodique pour la phase aqueuse. En général, nous l'avons choisie de *p*H égal à 6,0.

Le chloroforme R.P. a été redistillé avant usage ; la solution de phosphate a été préparée la veille de son utilisation selon la formule suivante : a) 90 g de $PO_4HNa_2$ pour 1 l. eau distillée
b) 85 g de $PO_4H_2K$ pour 1 l. eau distillée

On a mélangé 1 litre de a avec 800 ml de b.

*Appareil.* — L'appareil utilisé est un 50 tubes de Craig.

Le chloroforme a été réparti dans les tubes à raison de 11 ml environ par tube et l'on a procédé à 50 transferts afin de le saturer au moyen de la solution de phosphate avant de verser les alcaloïdes mis en solution chloroformique dans les 3 premiers tubes.

La séparation proprement dite a été effectuée le lendemain en respectant le processus suivant : 5 minutes d'agitation, 3 minutes de repos, ce qui, avec les opérations à effectuer, représentait environ 10 minutes par tube.

L'opération terminée, les fractions aqueuses et chloroformiques ont été recueillies séparément, les fractions chloroformiques étant directement évaporées, les fractions aqueuses étant alcalinisées par l'ammoniaque et extraites par le chloroforme avant d'être évaporées.

D'autre part, une chromatographie de chaque fraction a été réalisée.

**Résultats :**

Un premier contre-courant effectué avec un gramme d'alcaloïdes nous a fourni les résultats suivants qui sont traduits par la courbe des poids ci-contre (fig. 4) ainsi que par les chromatographies représentées (fig. 4 bis). Dans les trois premiers tubes, la séparation n'a pas été complète. Il reste plusieurs alcaloïdes. Dans les tubes 3 à 13 il apparaît un alcaloïde de $R_F$ 0,60 environ dans le butanol acétique, que nous avons identifié avec l'alcaloïde A précédemment isolé. Il est accompagné dans les premiers tubes de cette fraction par un alcaloïde en plus faible quantité, de $R_F$ 0,45 dans le butanol acétique (0,40 dans le butanol aqueux) que nous avons appelé alcaloïde D. A partir du tube 24, nous voyons apparaître deux alcaloïdes très voisins de A par le $R_F$ dans le butanol acétique et très voisins entre eux, que nous avons appelés E et F, puis un troisième de $R_F$ un peu plus faible, 0,50 environ dans le butanol acétique, que nous avons identifié avec l'alcaloïde B déjà rencontré précédemment. Enfin, des traces de deux autres alcaloïdes de $R_F$ plus faible (0,27 et 0,12) sont présentes dans plusieurs fractions, mais surtout vers la fin (tubes 35 à 40) (nous les avons appelés G et H).

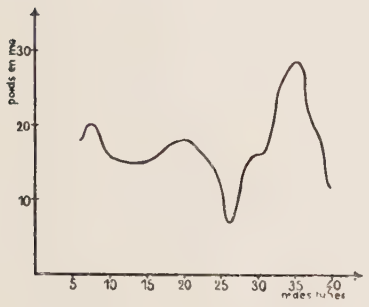



FIG. 4

La chromatographie sur papier dans le butanol aqueux et dans le butanol acétique de ces différents alcaloïdes nous a fourni les résultats suivants :

| | BUTANOL AQUEUX | BUTANOL ACÉTIQUE |
|---|---|---|
| Alcaloïde D : | 0,41 | 0,46 |
| Alcaloïde E : | 0,33 à 0,35 | 0,65 à 0,70 |
| Alcaloïde F : | 0,23 | 0,55 à 0,60 |
| Alcaloïde G | peu différent | 0,27 |
| Alcaloïde H | de 0 | 0,05 |

L'alcaloïde E bien que très voisin par ses $R_F$ de l'alcaloïde C déjà identifié dans les éluats de colonne, s'est révélé différent par les chromatographies comparatives et les spectres ultraviolets.

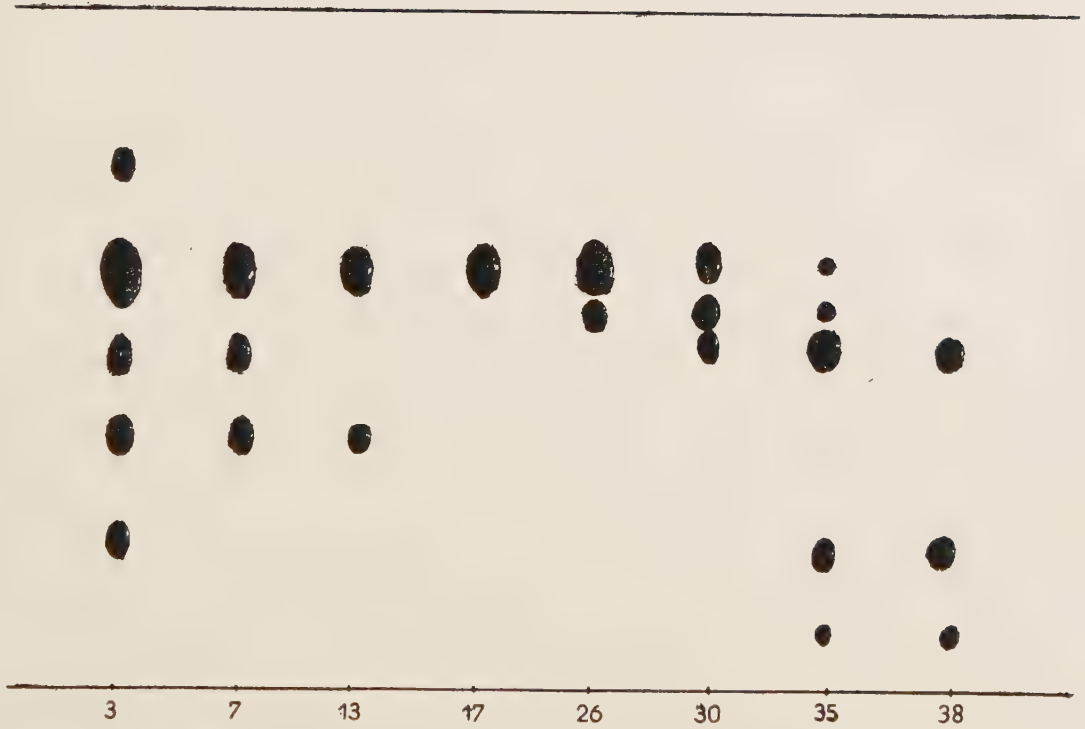



FIG. 4 bis. — *Chromatographie sur papier de différentes fractions du contre-courant (les chiffres indiquent les numéros des tubes)*

Le calcul des coefficients de partage selon la formule de Karlson et Hecker nous donne le tableau suivant :

| | K |
|---|---|
| Alcaloïde D : | 0,19 |
| Alcaloïde A : | 0,49 |
| » E + F : | 1,41 |
| » B : | 2,2 |
| » G + H : | 2,4 |

Enfin, nous avons encore isolé des trois premiers tubes des traces d'un alcaloïde qui a pour $R_F$ respectifs dans le butanol aqueux et acétique : 0,80 et 0,75 que nous avons appelé alcaloïde I, dont le coefficient de partage K serait peu différent de O.

Nous avons effectué plusieurs contre-courants successifs pour obtenir une quantité plus importante de chaque groupe d'alcaloïdes.

Nos efforts pour obtenir une meilleure séparation à l'intérieur de ces groupes n'ont pas été couronnés de succès, même en faisant varier le pH du bain phosphaté.

Pour arriver à isoler séparément les différents alcaloïdes, nous avons décidé de combiner l'élution sur colonne avec le contre-courant.

## 3° PURIFICATION DES ALCALOIDES

### A. — PAR ELUTION SUR COLONNE D'ALUMINE :

Nous avons traité successivement les fractions du contre-courant apres avoir regroupé ensemble celles qui avaient la même composition alcaloïdique.

1. L'élution des fractions qui contenaient essentiellement l'alcaloïde A (3 à 24 chloroformique ou aqueuse) nous a permis d'isoler celui-ci à partir du mélange éther éthylique/méthanol 95/5.

a) dans l'élution de la fraction chloroformique, il est précédé par l'alcaloïde I (qui passe le premier dans le benzène pur) suivi de l'alcaloïde C qui devait être présent avec A dans cette fraction mais que nous n'avions pas mis en évidence car le $R_F$ dans le butanol acétique est pratiquement le même (C passe dans les premieres fractions benzène/éther). Quelques traces de E et F passent également avant A (dans benzène/éther 19/1 et 9/1) ainsi que l'alcaloïde D (benzène/éther 4/1 et 1/1) ;

b) dans l'élution de la fraction aqueuse, si nous retrouvons les alcaloïdes précédents, il apparaît également au début de l'élution, dans le benzène pur, après des traces de l'alcaloïde I, un nouvel alcaloïde : J, dont les $R_F$ sont également très voisins de l'alcaloïde G et l'alcaloïde E. Nous verrons plus loin comment nous les avons distingués.

2. L'élution des fractions éther/méthanol 40/1, qui contenaient essentiellement les alcaloïdes B, E et F, nous a permis d'isoler B, mais celui-ci était souillé de légères traces d'alcaloïdes E et F. Ces différents alcaloïdes n'ont pu être séparés entre eux.

Nous sommes donc parvenu, par ce procédé, à obtenir séparément les alcaloïdes A, B et C, le plus abondant étant A suivi de B.

### B. — PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER :

Chaque fraction convenable de la chromatographie sur colonne ou du contre-courant a été chromatographiée sur papier en faisant un dépôt continu sur la ligne de départ, et en utilisant un développement de 7 à 8 heures (18 cm de course pour le solvant) dans le butanol aqueux. Une petite bande de 1 cm de large, découpée après dessication, de chaque côté de la feuille, a permis de localiser les alcaloïdes par révélation au Dragendorff. Il suffit ensuite de tracer les repères sur la partie non révélée et de découper les portions correspondantes pour obtenir des bandes de papier contenant les alcaloïdes isolés. Ces bandes étaient ensuite coupées en petits morceaux et mises à tremper 24 heures dans l'acide chlorhydrique à 5 %. Puis, on neutralise par l'ammoniaque et on extrait au chloroforme, à plusieurs reprises. La solution chloroformique est ensuite évaporée et l'on recueille les alcaloïdes. Nous avons pu ainsi isoler les alcaloïdes E, F et l'ensemble G + H que nous n'avons pas séparé.

## 4° ETUDE DE LA STRUCTURE DES ALCALOIDES ISOLES ET ESSAIS D'IDENTIFICATION

### A. — CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER ET ELECTROPHORESE COMPARATIVEMENT A DES ALCALOIDES DE REFERENCE

**Chromatographie :**

Nous avons pu disposer des alcaloïdes de lycopode suivants, envoyés par le Professeur Mac Lean, de la Mc Master University, Ontario (Canada) : lycopodine, dihydrolycopodine, alcaloïde L 8,

annotine, acrifoline, annotinine, α obscurine, β obscurine, ainsi que de la lycodine, l'α lofoline, la β lofoline, la clavolonine et la clavatine, adressées par le Professeur Ayer, de l'Université d'Alberta (Canada).

Nous avons chromatographié sur le même papier nos alcaloïdes et ces alcaloïdes de référence, dans les deux solvants habituels : butanol acétique et butanol aqueux, toujours sur papier phosphaté.

Les résultats sont résumés sur le tableau ci-joint (n° III) et sur les figures nos 5 à 8 bis.

Il peut être intéressant également de faire appel au $R_M$ qui, selon la formule de Bate-Smith et Westall (14), est égal à :

$$\log. \left( \frac{1}{R_F} - 1 \right)$$

En établissant le $R_M$ dans les deux solvants différents, et en calculant la différence $\Delta R_M$, nous pouvons classer les alcaloïdes comme indiqué sur le tableau n° IV.

Parmi les alcaloïdes de référence, trois alcaloïdes se distinguent par leur $\Delta R_M$ : ce sont la lycodine, l'annotinine et la β obscurine. Tous les autres forment un groupe assez homogène, dont le $\Delta R_M$ va décroissant de 0,63 (clavolonine) à 0,35 (annotine). Il faut noter la grande différence de résultats entre les deux obscurines.

Il semble que nous pouvons grouper nos alcaloïdes en trois sections :

les alcaloïdes B, E et F dont le $\Delta R_M$ est du même ordre que celui de L 8, de la clavolonine et des lofolines ;

les alcaloïdes A, D, K * et I qui se rapprochent de la lycodine ou de la β obscurine ;

les alcaloïdes C et J, voisins de la lycopodine.

En particulier, nous trouvons les mêmes chiffres pour l'alcaloïde F et L 8, ainsi que pour l'alcaloïde C et la lycopodine. B possède également le même $\Delta R_M$ que F.

* Au cours de cet examen chromatographique, nous nous sommes aperçu que l'alcaloïde J, isolé précédemment, n'était pas pur et contenait une petite quantité d'un alcaloïde dont les taches s'alignaient sur la lycodine et que nous avons appelé alcaloïde K.

TABLEAU N° III

## $R_F$ DES ALCALOIDES DE LYCOPODES ETUDIES

| ALCALOIDES | $R_F$ DANS LE BUTANOL AQUEUX | $R_F$ DANS LE BUTANOL ACÉTIQUE |
|---|---|---|
| Alcaloïde I | 0,70 | 0,75 |
| Lycodine | 0,60 | 0,71 |
| Alcaloïde K | 0,60 | 0,71 |
| » A | 0,60 | 0,68 |
| Annotinine | 0,58 | 0,44 |
| Clavatine | 0,44 | 0,68 |
| β obscurine | 0,44 à 0,55 | 0,48 |
| Dihydrolycopodine | 0,40 | 0,67 |
| Alcaloïde D | 0,40 | 0,45 |
| Lycopodine | 0,37 | 0,65 |
| Alcaloïde C | 0,37 | 0,65 |
| » J | 0,37 | 0,65 |
| α obscurine | 0,38 | 0,66 |
| Alcaloïde E | 0,33 à 0,35 | 0,65 |
| α lofoline | 0,25 | 0,58 |
| Alcaloïde F | 0,23 | 0,55 |
| L 8 | 0,23 | 0,55 |
| Acrifoline | 0,18 à 0,25 | 0,46 |
| β lofoline | 0,20 | 0,48 |
| Alcaloïde B | 0,12 à 0,17 | 0,46 à 0,50 |
| Annotine | 0,16 | 0,30 |
| Clavolonine | 0,11 | 0,35 |
| Alcaloïde G | 0 ? | 0,27 |
| » H | 0 ? | 0,05 |

## TABLEAU N° IV

### DIFFERENCE DES $R_M$ DANS LE BUTANOL ACETIQUE ET DANS LE BUTANOL AQUEUX POUR LES ALCALOIDES ETUDIES

| $\Delta R_M$ | ALCALOIDES DE RÉFÉRENCE | ALCALOIDES LYCOPODIUM PHLEGMARIA |
|---|---|---|
| + 0,63 | Clavolonine | |
| + 0,62 | L 8 | Alcaloïdes B et F |
| + 0,61 | α lofoline | |
| + 0,58 | | Alcaloïde E |
| + 0,56 | β lofoline | |
| + 0,53 | Acrifoline | |
| + 0,50 | Lycopodine | Alcaloïdes C et J |
| + 0,46 | α obscurine | |
| + 0,43 | Dihydrolycopodine | |
| + 0,43 | Clavatine | |
| + 0,35 | Annotine | |
| + 0,12 | | Alcaloïde I |
| + 0,10 | | Alcaloïde D |
| + 0,06 | Lycodine | Alcaloïde K |
| + 0,03 | β obscurine | |
| — 0,04 | | Alcaloïde A |
| — 0,35 | Annotinine | |

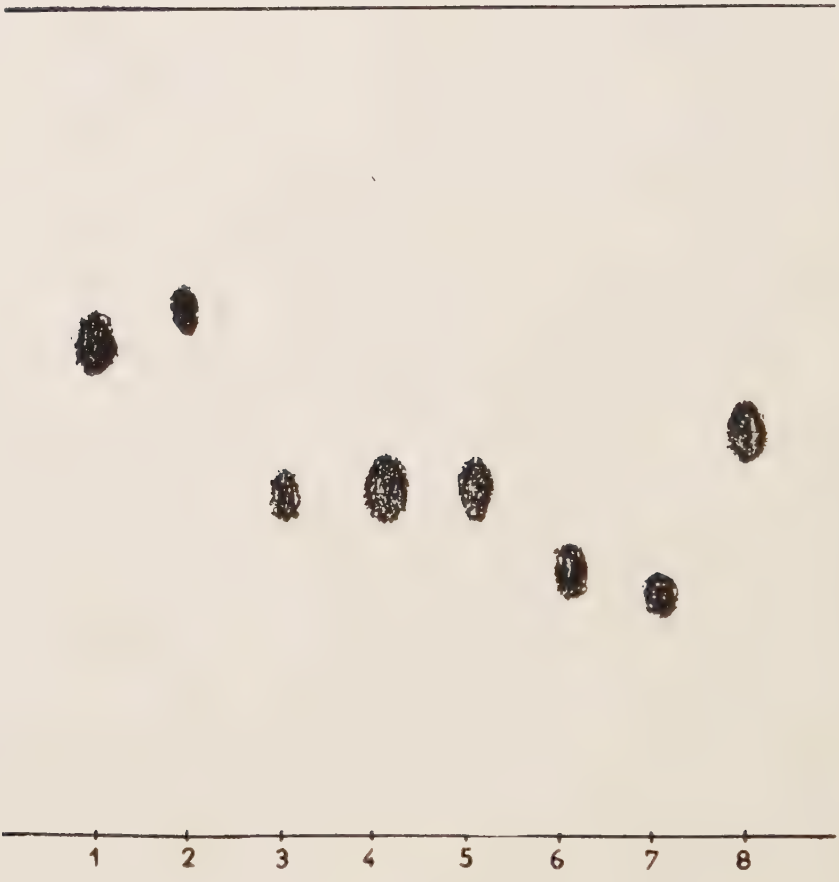



FIG. 5. — *Chromatographie dans le butanol acétique*

1. Lycopodine
2. Alcaloïde A
3. β Obscurine
4. Alcaloïde B
5. Acrifoline
6. Clavolonine
7. Annotine
8. α Obscurine

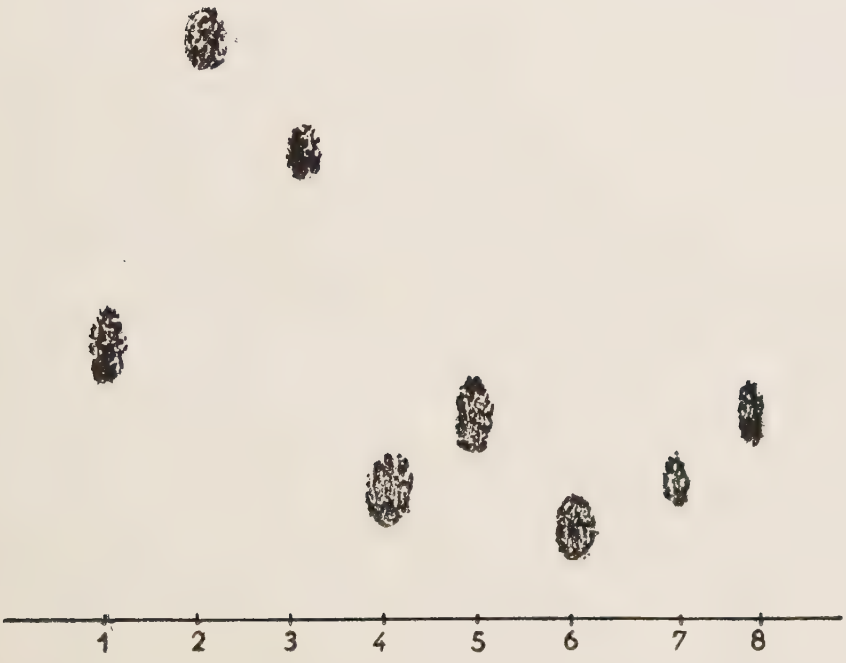



FIG. 5 bis. — *Chromatographie dans le butanol aqueux*

1. Lycopodine
2. Alcaloïde A
3. β Obscurine
4. Alcaloïde B
5. Acrifoline
6. Clavolonine
7. Annotine
8. α Obscurine

FIG. 6. — *Chromatographie dans le butanol acétique*

1. Lycopodine
2. Alcaloïde A
3. α Lofoline
4. Alcaloïdes G + H
5. Clavatine
6. Alcaloïde C
7. β Lofoline
8. Dihydrolycopodine

FIG. 6 bis. — *Chromatographie dans le butanol aqueux*

1. Lycopodine
2. Alcaloïde A
3. α Lofoline
4. Alcaloïdes G + H
5. Clavatine
6. Alcaloïde C
7. β Lofoline
8. Dihydrolycopodine

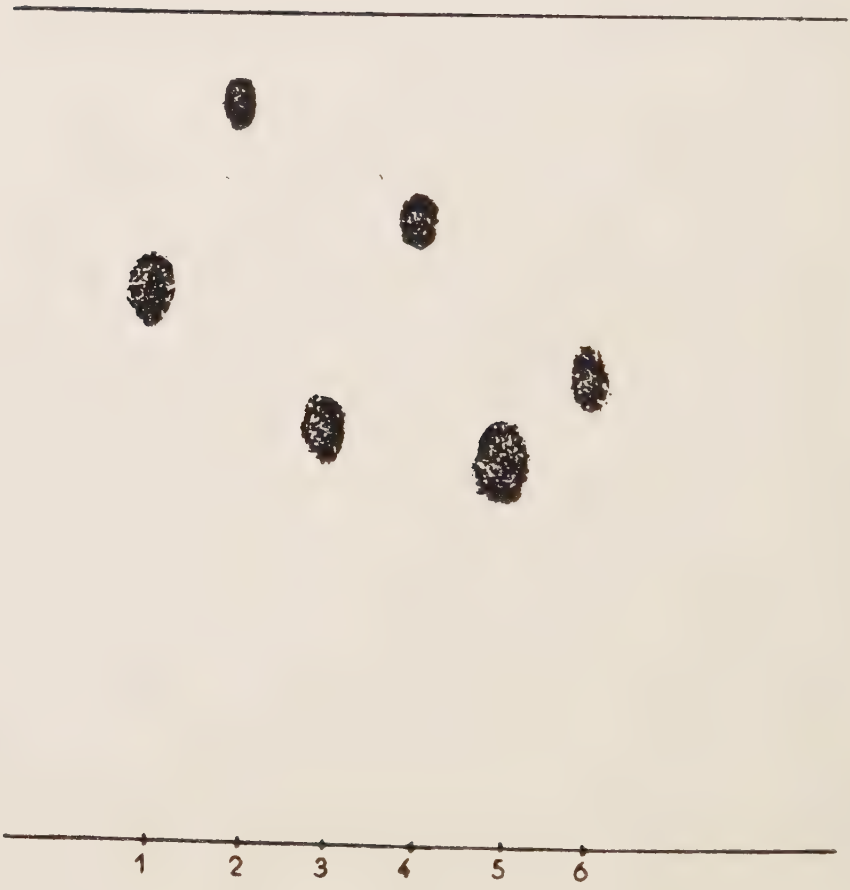



FIG. 7. — *Chromatographie dans le butanol acétique*

1. Lycopodine
2. Alcaloïde I
3. β Obscurine
4. Clavatine
5. Annotinine
6. Alcaloïde D

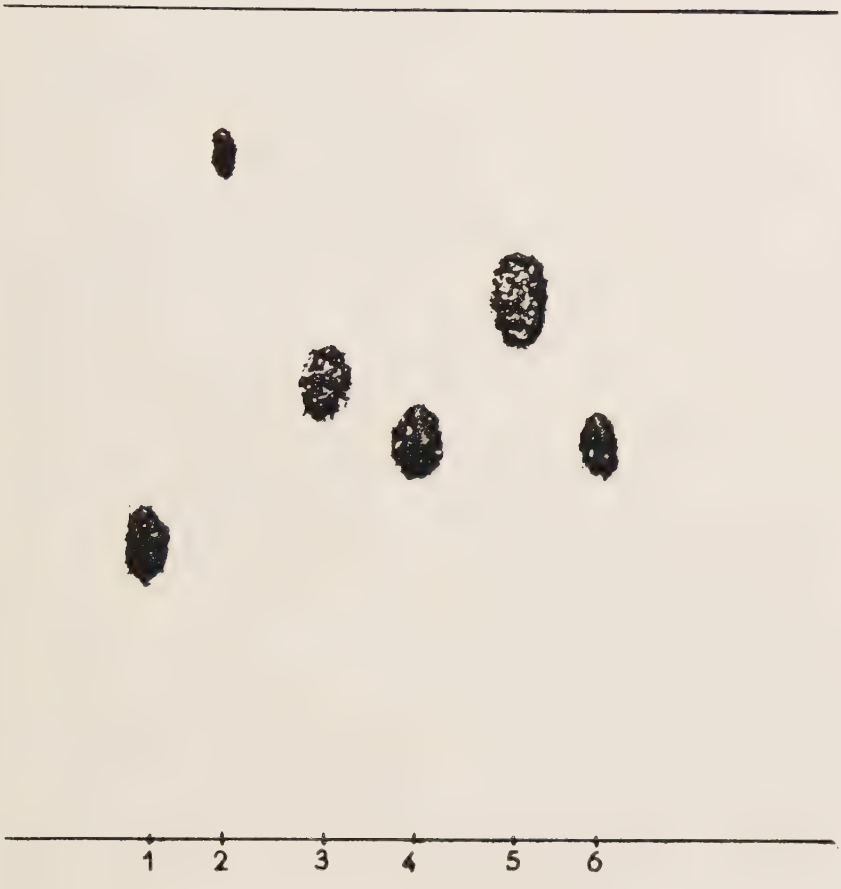



FIG. 7 bis. — *Chromatographie dans le butanol aqueux*

1. Lycopodine
2. Alcaloïde I
3. β Obscurine
4. Clavatine
5. Annotinine
6. Alcaloïde D

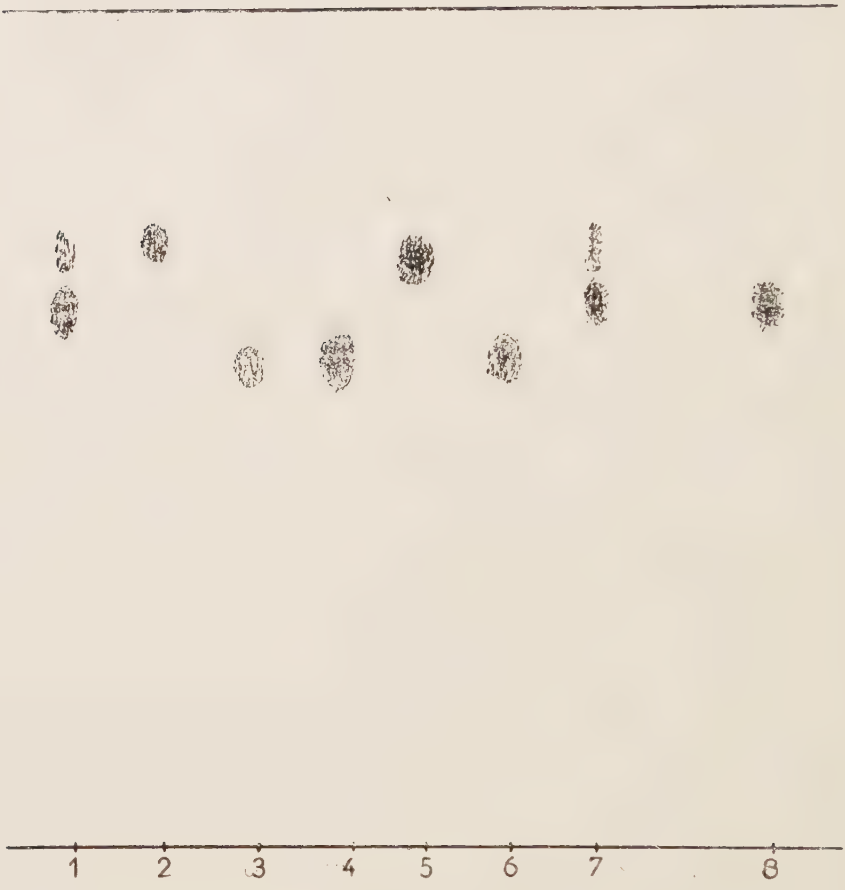



FIG. 8. — *Chromatographie dans le butanol acétique*

1. Alcaloïdes J + K
2. Lycodine
3. Alcaloïde F
4. L 8
5. Alcaloïde E
6. Alcaloïde F
7. Alcaloïdes J + K
8. Lycopodine

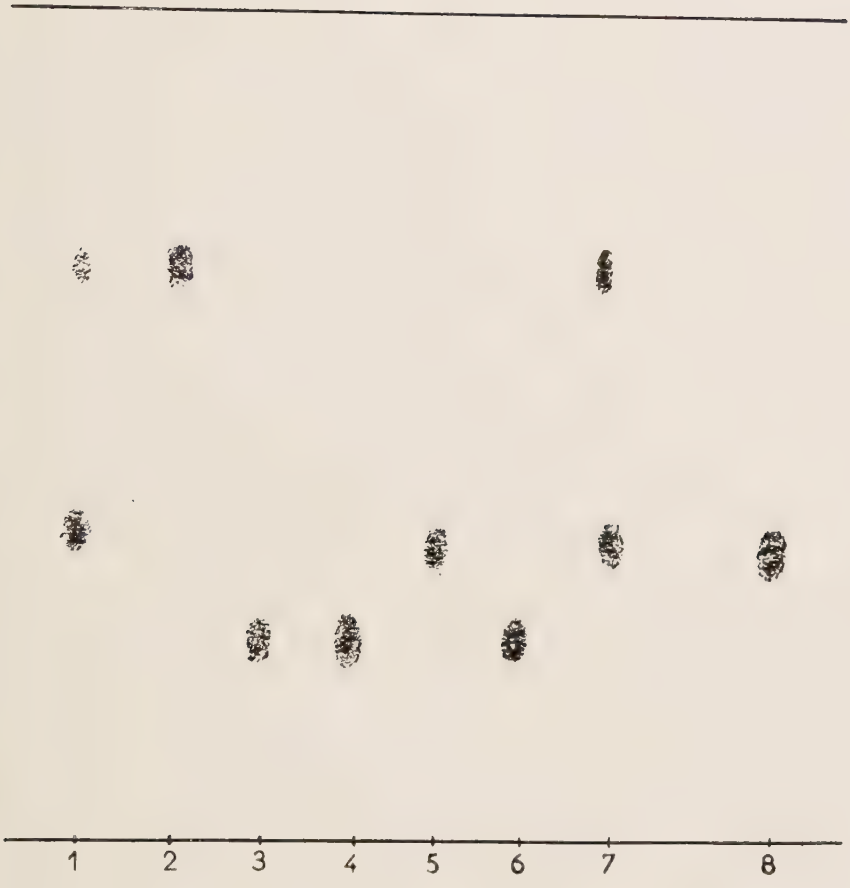



FIG. 8 bis. — *Chromatographie dans le butanol aqueux*

1. Alcaloïdes J + K
2. Lycodine
3. Alcaloïde F
4. L 8
5. Alcaloïde E
6. Alcaloïde F
7. Alcaloïdes J + K
8. Lycopodine

**Electrophorèse :**

Nous l'avons réalisée selon la méthode indiquée précédemment.

Nous obtenons des déplacements assez voisins les uns des autres (cf. fig. nos 9 et 10). Depuis le départ, nous trouvons d'abord les alcaloïdes qui ont le plus faible déplacement :

— les obscurines, la dihydrolycopodine, les lofolines, l'annotinine, très peu différents les uns des autres ;

— puis l'acrifoline, l'alcaloïde B, la clavatine, la clavolonine, l'annotine ;

— ensuite la lycopodine, L 8, l'alcaloïde F et l'alcaloïde C ;

— légèrement en avant de la lycopodine, les alcaloïdes E et J ;

— enfin, nettement plus en avant, la lycodine, en face de laquelle vient se placer l'alcaloïde K, impureté de l'alcaloïde J, signalée ci-dessus.

Les résultats fournis par l'électrophorèse, s'ils n'infirment pas les renseignements fournis par la chromatographie, sont nettement moins probants.

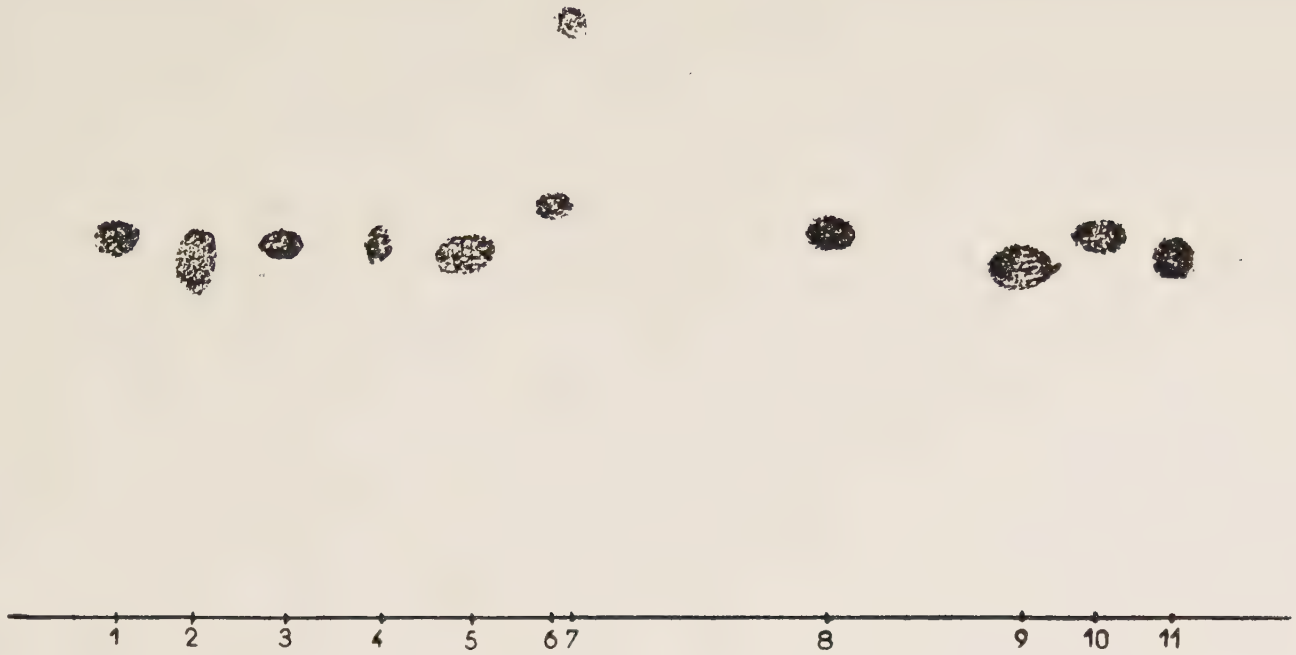



FIG. 9. — *Electrophorèse des alcaloïdes*

1. Lycopodine
2. Alcaloïde A
3. Acrifoline
4. Alcaloïde B
5. β Ob curine
6 7. Alcaloïdes J +K
8. Alcaloïde E
9. α Obscurine
10. Alcaloïde C
11. Alcaloïde F

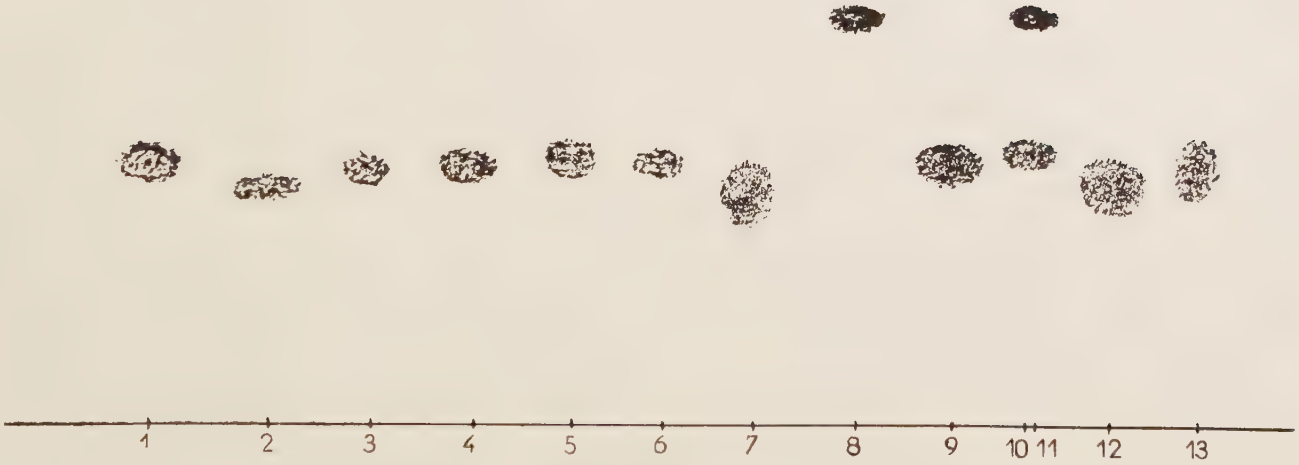



FIG. 10. — *Electrophorèse des alcaloïdes*

1. Lycopodine
2. α Lofoline
3. Alcaloïde F
4. Clavatine
5. Annotine
6. L 8
7. β Lofoline
8. Lycodine
9. Clavolonine
10/11. J + K
12. Dihydrolycopodine
13. Annotinine

## B. — SPECTROGRAPHIE ULTRA-VIOLETTE

**Technique :**

Nous avons utilisé le spectrophomètre différentiel enregistreur de Lérès et le spectrophomètre Beckmann muni d'un dispositif enregistreur ; tous deux, avec des moyens d'investigation différents, donnent des résultats concordants.

Les alcaloïdes ont été mis en solution dans l'alcool à 98° redistillé. L'absorption a été mesurée entre 215 et 315 mμ.

**Résultats :**

Les *alcaloïdes de référence* se classent en trois groupes nettement différents :

a) *Lycodine.* — Le spectre obtenu est conforme à celui publié par Anet et Eves (6). Nous constatons la présence d'un maximum important vers 267,5 mμ, avec un épaulement à 275 mμ que Anet et Eves attribuent au noyau pyridinique.

Un autre maximum doit se situer en deçà de 220 mμ. Les maximums d'absorption ne sont pas très élevés car la quantité de produit était très faible.

b) *Les obscurines.* — Le noyau lactame qu'elles possèdent leur confère des spectres caractérisés par des maximums prononcés :

pour l'α obscurine (1 seule double liaison) (fig. 13) : un maximum élevé se situe vers 255 mμ ;

pour la β obscurine (2 doubles liaisons) il y en a un vers 231 mμ et un autre se dessine au-dessus de 310 mμ.

c) *Le groupe de la Lycopodine :*

1. La lycopodine possède un spectre caractérisé par un maximum élevé vers 225 mμ, avec un deuxième maximum très faible vers 285 mμ (fig. 11). Nous retrouvons un spectre de même type dans l'alcaloïde L 8 (avec un maximum plus important à concentration équivalente à 285 mμ), l'annotine (même remarque) et semble-t-il, l'annotinine.

A ce type se rattachent les alcaloïdes suivants de *Lycopodium phlegmaria* L. :

— alcaloïde F, avec un maximum assez important pour 285 mμ ;

— alcaloïde B, dont le maximum à 285 mμ est assez fort et surtout qui a l'autre maximum (le plus élevé) déplacé vers les longueurs d'ondes plus grandes (225 à 232 mμ) ;

Le spectre de l'alcaloïde C n'est pas satisfaisant et ne peut pas être interprété.

2. Une autre partie des alcaloïdes de ce groupe, de structure voisine, possède des spectres un peu différents caractérisés par la présence d'un troisième maximum, intermédiaire entre les deux indiqués à la fois en grandeur et en longueur d'onde. Ceci est particulièrement net dans les spectres de :

— la clavolonine, ce maximum se situant vers 255 mμ ;

— l'acrifoline (idem) (fig. 12),

et nous le retrouvons dans nos alcaloïdes E et I (peut-être également dans A mais beaucoup moins nettement).

Les spectres de la clavatine et des lofolines sont plus difficiles à interpréter par suite d'une concentration trop faible. Si le maximum intermédiaire est visible dans la clavatine, il ne semble pas être présent dans les lofolines. Si nous considérons maintenant les alcaloïdes de structure élucidée, nous nous apercevons que dans la deuxième partie (maximum vers 255 mμ) se trouvent tous ceux possédant une fonction oxhydryle, à l'exception de L 8 et de l'annotine qui en possèderaient une, mais dont on ignore la position. D'autre part, tous les alcaloïdes possédant une fonction $=C=O$ présentent le maximum principal vers 220 mμ, alors qu'il paraît absent pour les autres (dihydrolycopodine). Il semble donc logique d'admettre que le maximum élevé vers 220 mμ correspond au chromophore $=C=O$.

En général, le maximum d'absorption attribuable à un groupement carbonyle fixé sur une chaîne droite se situe vers 270-280 mμ (58) (Acétone 272 mμ), mais lorsque le groupement $=C=O$ est fixé sur un noyau plus compliqué, le maximum d'absorption se déplace nettement vers l'U.V. (Cyclo-propylallyl-cétone maximum vers 220 mμ). On peut donc penser par extrapolation qu'un groupement $=C=O$ fixé sur une structure polycyclique comme celle de nos alcaloïdes a son maximum d'absorption vers 220 mμ.

Il serait intéressant de vérifier si le maximum intermédiaire vers 255 mμ ne pourrait pas être rattaché à la présence d'une deuxième fonction (OH plus précisément) sur le squelette de l'alcaloïde, du moins dans la position correspondant à l'acrifoline ou la clavolonine puisque L 8, bien que possédant une fonction OH, ne semble pas présenter un tel maximum.

L'inversion de la position des fonctions OH et CO dans l'acrifoline et la clavolonine ne modifie guère le spectre.

Il faut remarquer également que, dans certains cas, le maximum plus faible vers 285 est accompagné d'un deuxième maximum de même ordre vers 290/300 (acrifoline, clavolonine, alcaloïdes A et I).

Nous pouvons donc provisoirement tirer les conclusions suivantes :

1. Similitude probable des spectres de l'alcaloïde F et de L 8.

2. L'alcaloïde B a un spectre de type lycopodine, mais le maximum est nettement décalé vers les grandes longueurs d'onde (232 au lieu de 225).

3. Les spectres des alcaloïdes E et I présentent une grande analogie avec les spectres de la clavolonine et de l'acrifoline ; le spectre de l'alcaloïde A semble également avoir une certaine parenté avec les précédents, mais le maximum intermédiaire est beaucoup moins net. Les spectres de E et de I sont d'ailleurs plus proches de celui de la clavolonine que de celui de l'acrifoline, car, dans celle-ci, le maximum intermédiaire est plus élevé (rôle de la double liaison ?).

5. Nous avons classé à part le spectre de l'alcaloïde J impur, qui contient l'alcaloïde K. En effet, le spectre U.V. semble bien indiquer les deux maximums correspondants à ceux de la lycodine (267,5/275). Si l'on considère ce spectre comme l'addition de deux spectres dus respectivement aux alcaloïdes J et K, et si l'on admet que K a le spectre de la lycodine, J possèderait un spectre du type F ou de la lycopodine. Les résultats de chromatographie, d'électrophorèse et de spectrographie U.V. semblent indiquer l'identité de l'alcaloïde K et de la lycodine.

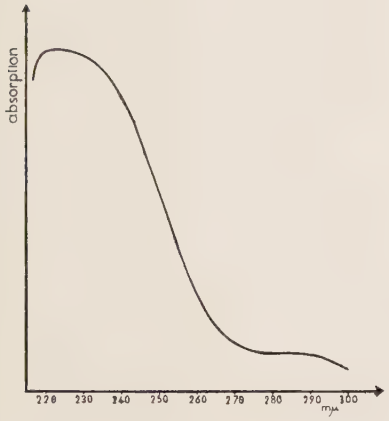
## TABLEAU N° V

### SPECTRES U.V.

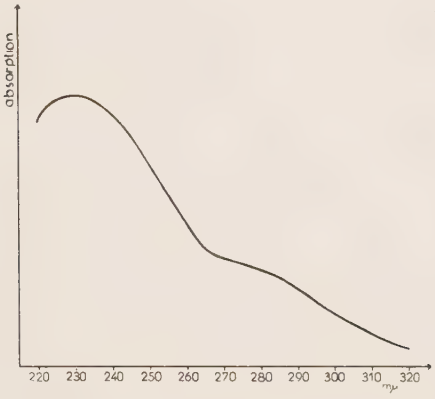
*(maximum en angstrœms)*

**Alcaloïdes :**

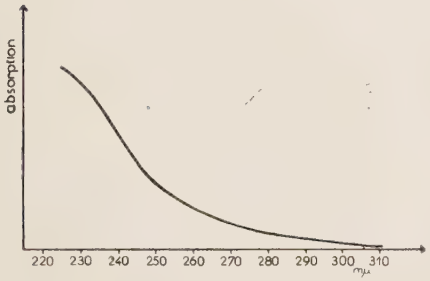
| | | |



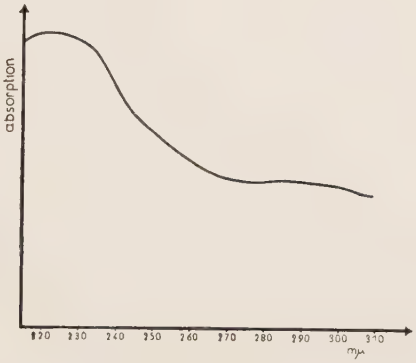

Lycopodine



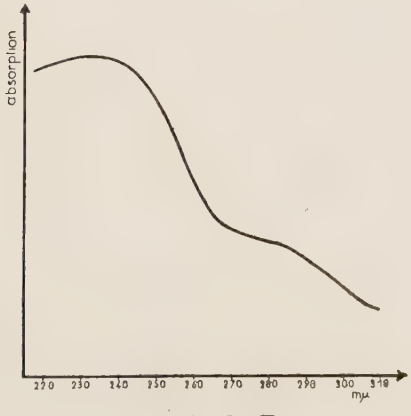

L 8




Alcaloïde C

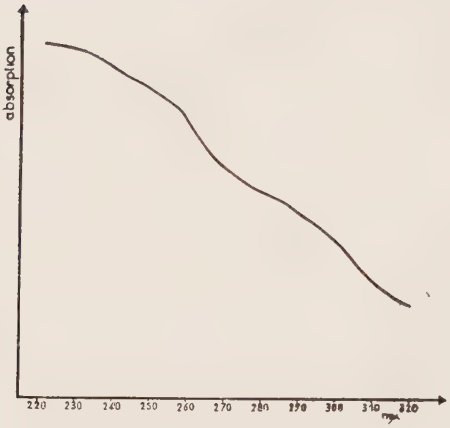



Alcaloïde F

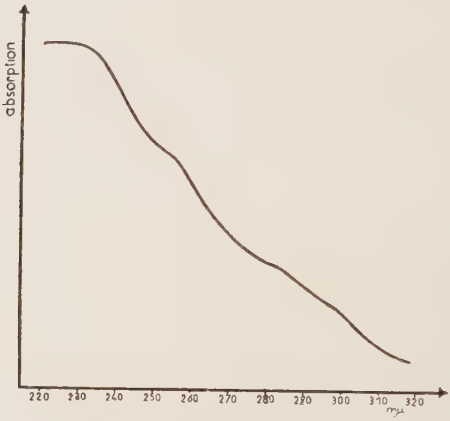



Alcaloïde B

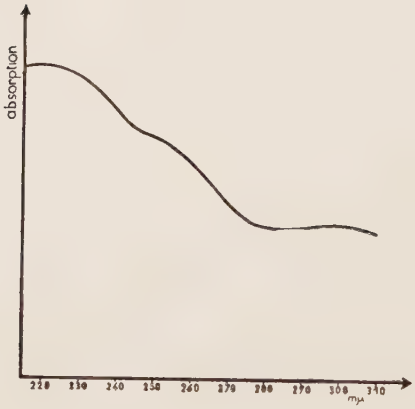
FIG. 11. — *Spectres U.V.*



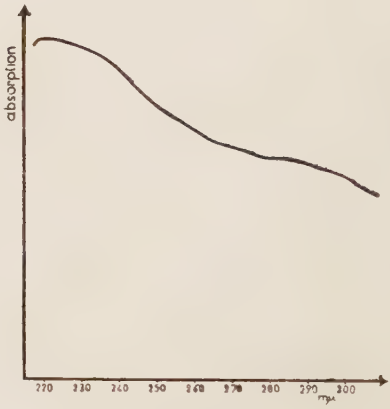

Acrifoline



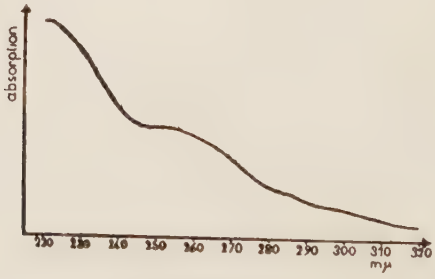

Clavolonine




Alcaloïde E

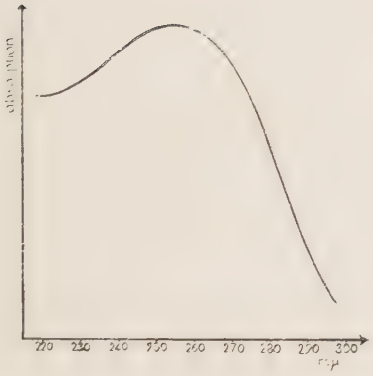



Alcaloïde A

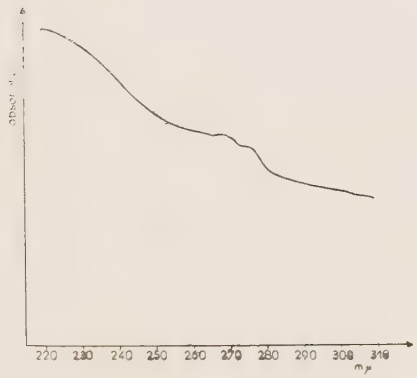



Alcaloïde I

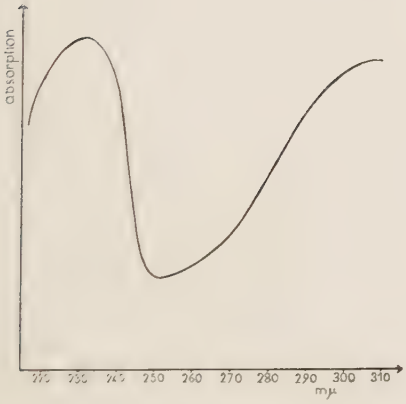
FIG. 12. — *Spectres U.V.*



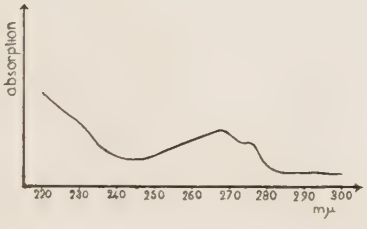

α obscurine




Alcaloïdes J + K




β obscurine




Lycodine

FIG. 13. — *Spectres U.V.*

## C. — SPECTROGRAPHIE INFRA-ROUGE

Nous avons enregistré les spectres d'absorption infra-rouge de douze alcaloïdes de référence et d'un certain nombre des alcaloïdes que nous avions isolés. Il ne nous a pas été possible en effet d'enregistrer le spectre de la lycodine dont nous possédions une quantité trop faible, ni de l'alcaloïde I pour la même raison. D'autre part, comme nous n'avions pas séparé les alcaloïdes G et H, il nous a paru inutile de faire le spectre I.R. du mélange.

Les spectres ont été réalisés au moyen d'un spectrographe Perkin-Elmer, modèle 21, à prisme de chlorure de sodium et à double faisceau (évitant ainsi l'absorption de la vapeur d'eau et du gaz carbonique de l'atmosphère). Les nombres d'ondes sont mesurés à $\pm$ 5 $cm^{-1}$ dans le domaine 600 à 2000 $cm^{-1}$ et à $\pm$ 10 $cm^{-1}$ environ dans la région de 3000 $cm^{-1}$.

Les alcaloïdes de référence, ainsi que les alcaloïdes C et F ont été dispersés dans du bromure de potassium (2 mg environ de produit pour 250 mg de bromure de potassium) et spectrographiés sous forme de pastille.

Les alcaloïdes A, B et l'alcaloïde J impur (contenant l'alcaloïde K) ont été dissous dans une faible quantité d'acétone, la solution étant ensuite évaporée sur une lame de chlorure de sodium.

Les spectres de l'$\alpha$ et de la $\beta$ lofoline (fig. 26/27) sont très comparables à ceux obtenus par Anet et Khan (7) pour ces deux composés. La résolution est ici légèrement meilleure, ces auteurs disposant seulement d'un Infracord Perkin-Elmer. Les bandes à 1400 $cm^{-1}$ et 2900 $cm^{-1}$ sont plus nettes, n'étant pas masquées par les bandes fortes du nujol que ces auteurs ont utilisé comme dispersant.

Les spectres de tous ces alcaloïdes examinés sont complexes et leur interprétation n'est pas simple. Nous les avons examinés plus particulièrement dans trois régions :

1. la région 3200-3400 $cm^{-1}$ des bandes d'association des groupements OH et NH ;
2. la région 1650-1750 $cm^{-1}$ de la vibration de valence du groupement $C = O$ ;
3. la région 1400-1500 $cm^{-1}$ des vibrations de déformation des groupements $CH_2$, $CH_3$.

Les observations correspondantes sont rassemblées dans le tableau VI.

Nous avons également essayé de comparer les spectres des alcaloïdes inconnus à ceux des alcaloïdes de référence.

Les remarques suivants ont été effectuées :

1. L'examen des spectres de l'alcaloïde A (fig. 18) et de l'alcaloïde E (fig. 20) est peu concluant. Il est probable que ces corps ne sont pas suffisamment purifiés. Ces deux alcaloïdes présentent des bandes C = O fortes (cf. tableau). L'alcaloïde A présente de très fortes associations dans le domaine OH-NH alors que l'alcaloïde E possède de faibles bandes dans ce domaine ;
2. L'alcaloïde J impur (fig. 21) (contenant des traces d'alcaloïde K) présente un spectre avec peu d'associations OH (cf. alcaloïde E), une bande C = O à 1695 $cm^{-1}$, une bande $CH_2$ nette à 1455 $cm^{-1}$ avec des inflexions (cf. alcaloïde E).

   Ce spectre ne confirme pas l'identité de l'alcaloïde K et de la lycodine, hypothèse que nous avions faite d'après les résultats de la chromatographie et de la spectrographie U.V. Peut-être la quantité de l'impureté K contenue dans J serait-elle trop faible pour influer suffisamment sur le spectre ? ;
3. L'alcaloïde B (fig. 19) présente deux bandes = C = O : à 1730 $cm^{-1}$, une bande assez fine et intense ; à 1700 $cm^{-1}$ une bande plus faible et large faisant penser à une association, un certain nombre de groupements C = O pouvant s'associer avec un groupement hydrogène, NH par exemple, ce qui expliquerait une bande large et moyenne observée vers 3200/3300 $cm^{-1}$, et les bandes 1550/1600 $cm^{-1}$. La bande $CH_2$ à 1450 $cm^{-1}$ de ce composé est très intense ainsi que la bande à 1375 $cm^{-1}$ (déformation symétrique du groupement $CH_3$). D'autre part, la présence de bandes vers 1650 — 1600 — 1550 $cm^{-1}$ rend possible la présence de doubles liaisons ;
4. Les spectres de l'alcaloïde C (fig. 15) et de l'alcaloïde F (fig. 17) sont les plus satisfaisants.

   L'alcaloïde F a un spectre très voisin de l'alcaloïde L 8 (fig. 16). Il y a cependant trois différences nettes :

   a) le composé F a une bande C = O faible de plus que le composé L 8 (à 1235 $cm^{-1}$) ;
   b) la bande $CH_2$ à 1430 $cm^{-1}$ est moins intense que pour L 8 ;
   c) L 8 possède une bande à 675 $cm^{-1}$ que l'on ne retrouve pas dans F, où elle est remplacée par une bande à 720 $cm^{-1}$.

   On peut donc penser à deux structures voisines mais non semblables.

   L'alcaloïde C a un spectre identique à la lycopodine (fig. 14). Son spectre est peut-être un peu moins beau (la lycopodine étant mieux cristallisée), mais on y retrouve tout l'ensemble des bandes (à de très faibles différences d'intensité près, marquées par une croix sur le spectre pour quelques-unes).

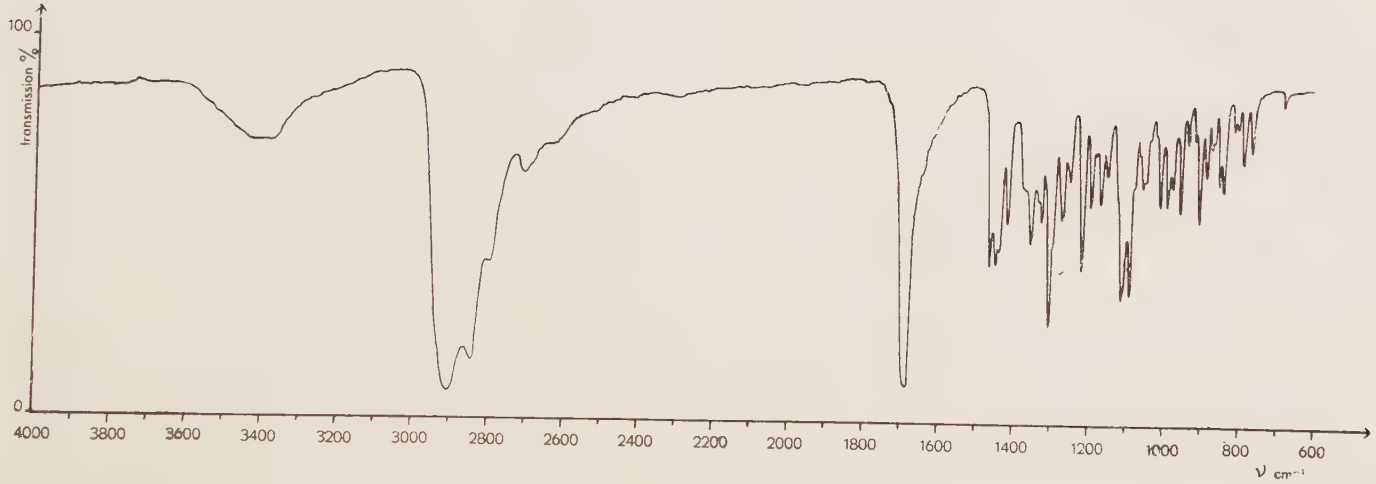
TABLEAU N° VI. — **SPECTRES INFRA-ROUGES**

| | 3400 — 3200 cm$^{-1}$ | 1750 - 1650 cm$^{-1}$ | 1500 - 1400 cm$^{-1}$ |
|---|---|---|---|
| Lycopodine | Traces d'association | Bande forte ..... 1695<br>» faible ..... 1650 | 4 bandes nettes : 1425<br>1445 basse<br>1455<br>1470 |
| Dihydrolycopodine | Bande forte ..... 3150<br>Bande large et moyenne .. 3350 | Pas de bande C = O<br>Bande faible, large ..... 1630 | 4 bandes nettes : 1450 forte<br>1430 moyenne<br>1440 »<br>1470 » |
| Acrifoline | 2 bandes larges ..... 3300<br>3400 | Bande forte ..... 1705<br>» moyenne ..... 1675<br>» faible ..... 1525 | 2 bandes : 1440<br>1470<br>2 inflexions : 1420<br>1450 |
| Clavolonine | 1 bande forte assez mince 3200<br>1 bande large à 3360 - 3400 | Bande forte, fine ..... 1685<br>» faible ..... 1650<br>Une légère inflexion ..... 1710 | 4 bandes nettes : 1420 moyenne<br>1445 »<br>1455 assez forte<br>1470 moyenne |
| α Lofoline | Assez grosse association<br>large et double 3200 - 3400 | Bande forte, étroite .... 1725<br>» très faible ..... 1775<br>» faible ..... 1670 | 4 bandes nettes : 1435<br>1450<br>1460<br>1470<br>et 1 inflexion à 1420 |

| | 3400 - 3200 $cm^{-1}$ | 1750 - 1650 $cm^{-1}$ | 1500 - 1400 $cm^{-1}$ |
|---|---|---|---|
| β Lofoline | 1 bande fine moyenne à 3460<br>1 bande large moyenne à 3070 | 2 bandes sensiblement de même intensité ..... 1700<br>1725 | 1 bande : 1450<br>2 inflexions : 1430<br>1470<br><br>2 bandes fortes : 1430<br>1465 |
| L 8 | 1 bande intense, multiple, pas très large à 3200 | Bande très forte, étroite 1705<br>» faible .... 1660 - 1670 | 4 inflexions : 1425<br>1445<br>1455<br>1475 |
| Annotine | Association large d'intensité moyenne 3200 - 3300 | Bande forte ..... 1715<br>2 inflexions ..... 1670<br>1685<br>Bande faible ..... 1630 | 1 bande à 1450<br>2 inflexions : 1440<br>1465 |
| Annotinine | 2 bandes faibles vers 3400 - 3500 | Bande très forte et large 1770<br>Plusieurs bandes faibles.. 1730<br>1750<br>1800<br>1840 | 3 bandes : 1435 moyenne<br>1460 assez forte<br>1470 assez forte<br>1 inflexion : 1450 |
| Clavotine | 1 bande moyenne, assez fine à 3450<br>1 bande large à 3050 | Bande forte et étroite .. 1695 | 3 bandes moyennes 1410<br>1450<br>1465<br>1 inflexion : 1475 |

| | 3400 - 3200 $cm^{-1}$ | 1750 - 1650 $cm^{-1}$ | 1500 - 1400 $cm^{-1}$ |
|---|---|---|---|
| α Obscurine | 1 bande moyenne et large vers 3450<br>3 bandes fines à 3095<br>3150<br>3190 | Bande forte ..... 1665<br>» moyenne ..... 1695<br>» large, moyenne .. 1635 | 1415 faible<br>1435 moyenne<br>1445 assez forte<br>1455 moyenne<br>1465/70 double faible |
| β Obscurine | 1 bande assez faible à 3450<br>1 bande large et forte à 3060 | Bande très forte, large... 1650<br>Bandes faibles ..... 1616<br>1600<br>1550 | 1415 forte<br>1450 forte<br>1445 basse<br>1460 basse |
| Alcaloïde A | De très grosses associations 3100 - 3400 | Plusieurs bandes mais surtout :<br>1 bande nette à ..... 1700<br>1 bande faible à ..... 1735 | 3 bandes : 1425 moyenne<br>1455 forte<br>1475 inflexion |
| Alcaloïde B | Peu d'associations 3100 - 3300 | 2 bandes C — O :<br>Bande faible ..... 1700<br>» forte ..... 1730<br>1 bande faible et large à 1600 - 1650 | 1 bande nette à 1450<br>et des inflexions |
| Alcaloïde C | 1 légère bande d'association 3400 | Bande forte ..... 1695<br>Bandes faibles ..... 1650<br>1670 | 4 bandes nettes : 1425<br>1445 basse<br>1455<br>1470 |

| | 3400 - 3200 cm-1 | 1750 - 1650 cm-1 | 1500 - 1400 cm-1 |
|---|---|---|---|
| Alcaloïde E | De faibles bandes d'association large 3400 | Bande forte ..... 1725<br>2 inflexions ..... 1715<br>1695<br>Bande à ..... 1550 | 1 bande forte à 1455<br>et de nombreuses inflexions |
| Alcaloïde F | De faibles bandes d'association 3150 - 3400 | Bande forte ..... 1695<br>» faible, large .... 1735<br>Bandes à 1650-1600 et 1550 ? | 2 inflexions : 1425 moyenne<br>1465 forte<br>1450<br>1475 |
| Alcaloïdes J + K | Peu d'associations | 1 bande à 1695 | 1 bande nette à 1455<br>et des inflexions |

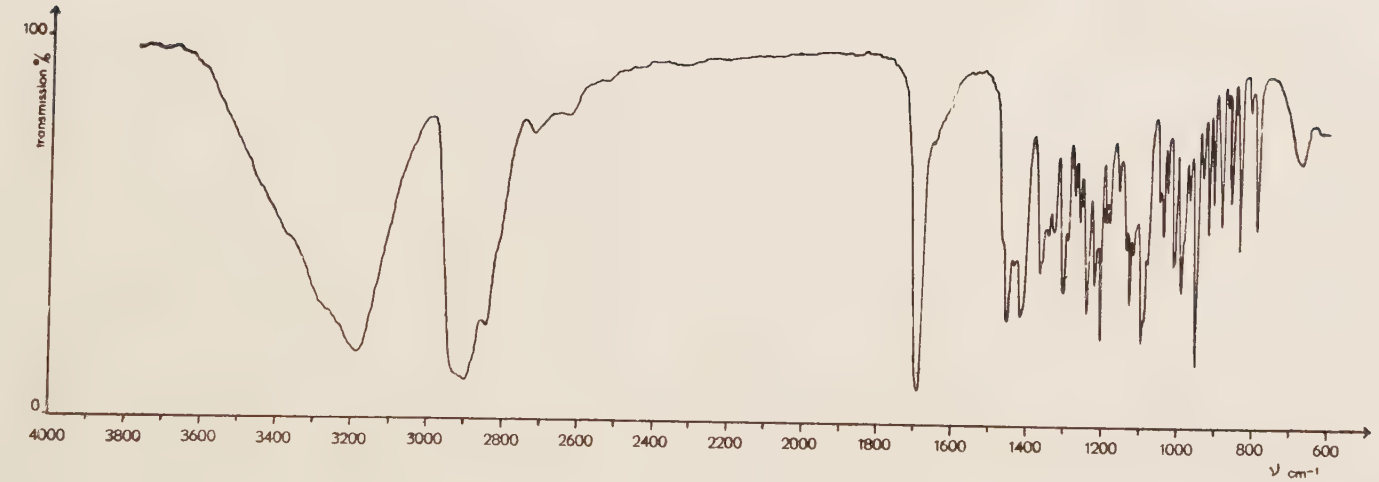



Lycopodine

FIG. 14. — *Spectre I.R.*

Alcaloïde C

FIG. 15. — *Spectre I.R.*

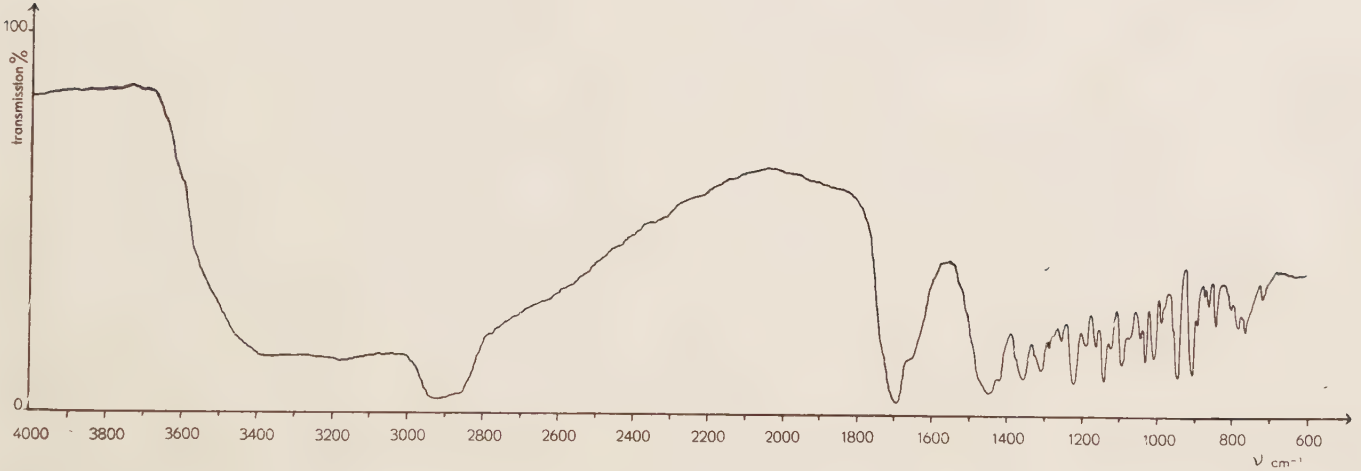



L 8

FIG. 16. — *Spectre I.R.*

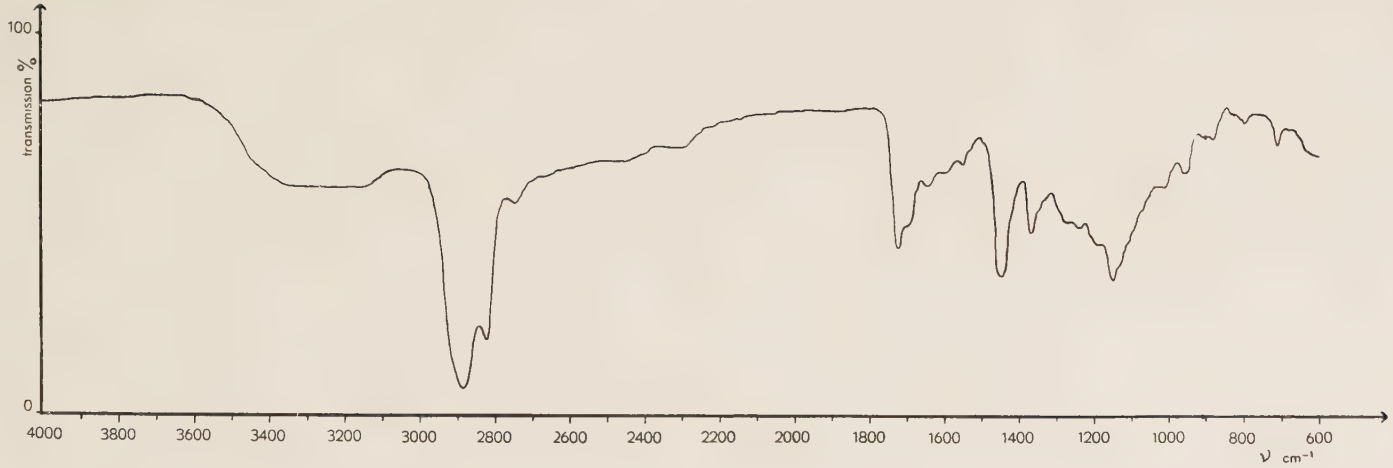
Alcaloïde F

FIG. 17. — *Spectre I.R.*



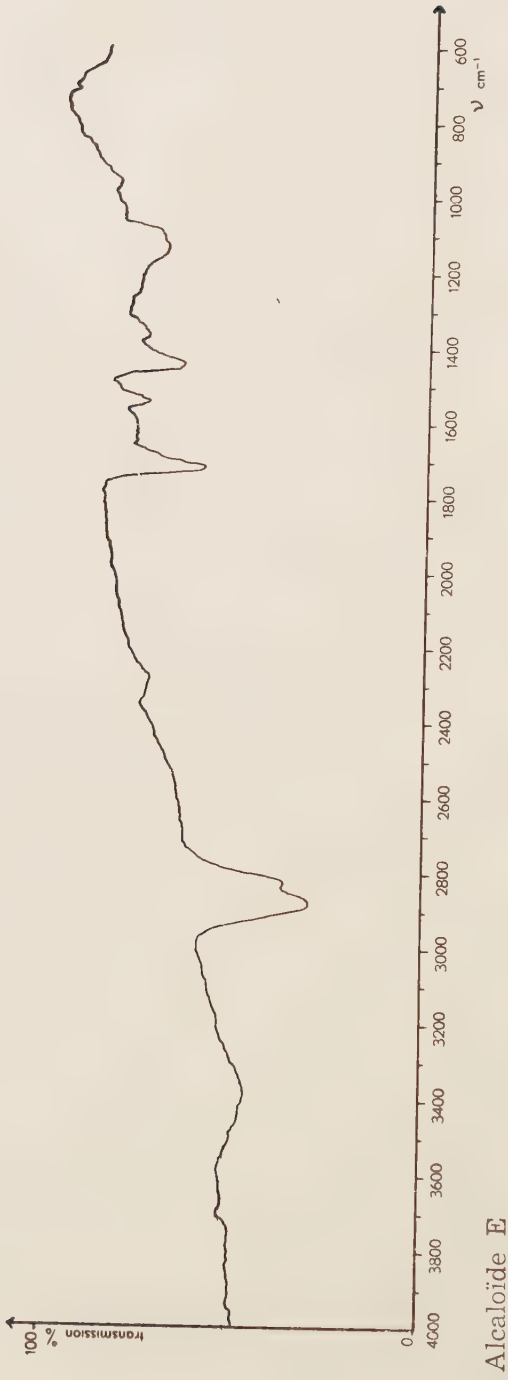

Alcaloïde A

FIG. 18. — *Spectre I.R.*



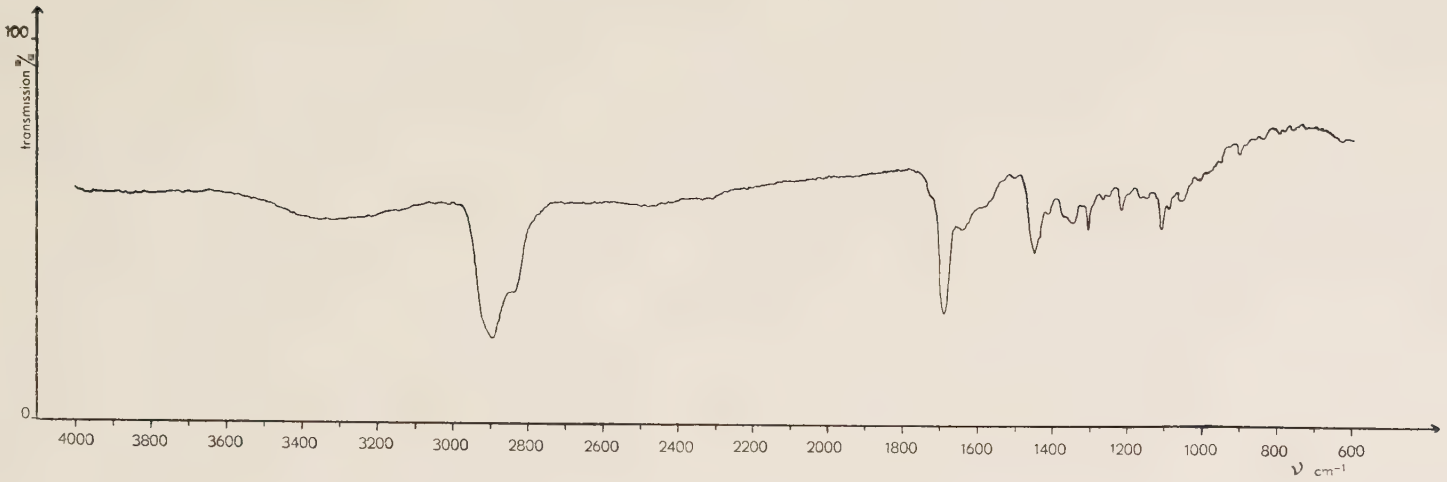

Alcaloïde B

FIG. 19. — *Spectre I.R.*



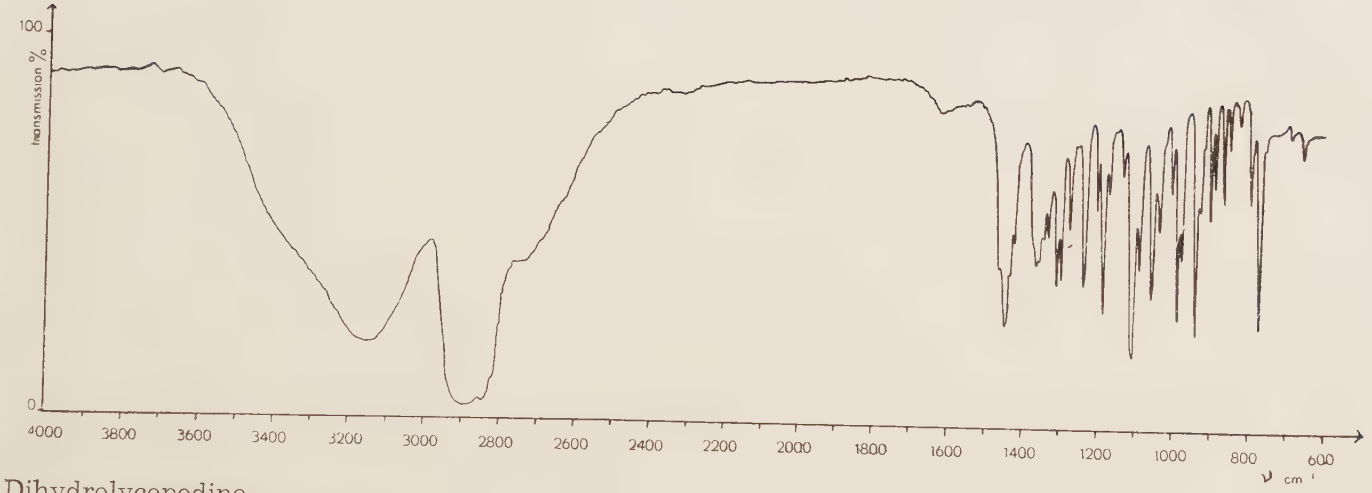

Alcaloïde E

FIG. 20. — *Spectre I.R.*



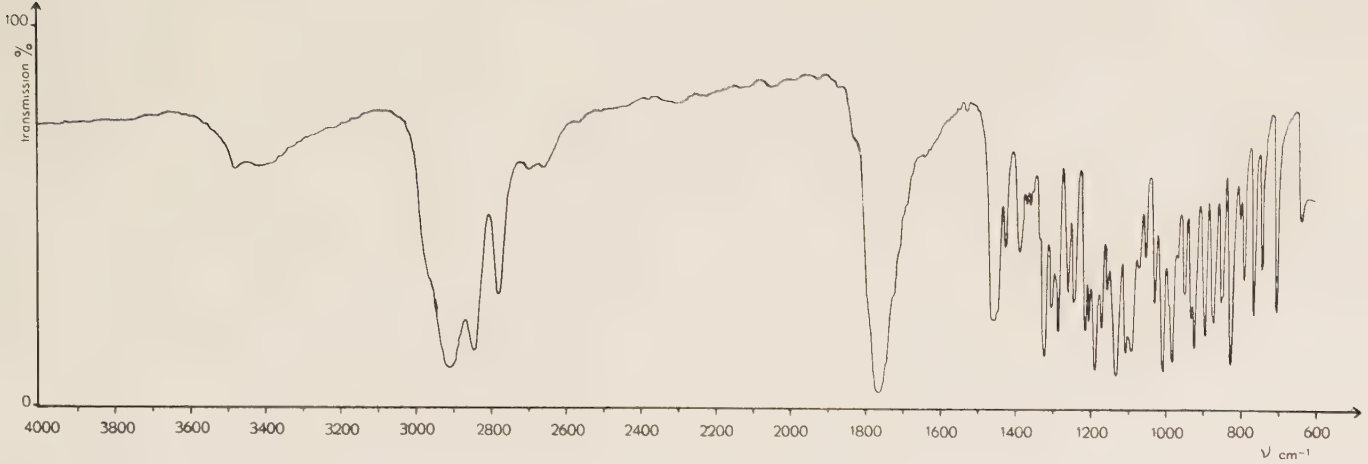

Alcaloïde J (+ K)

FIG. 21. — *Spectre I.R.*



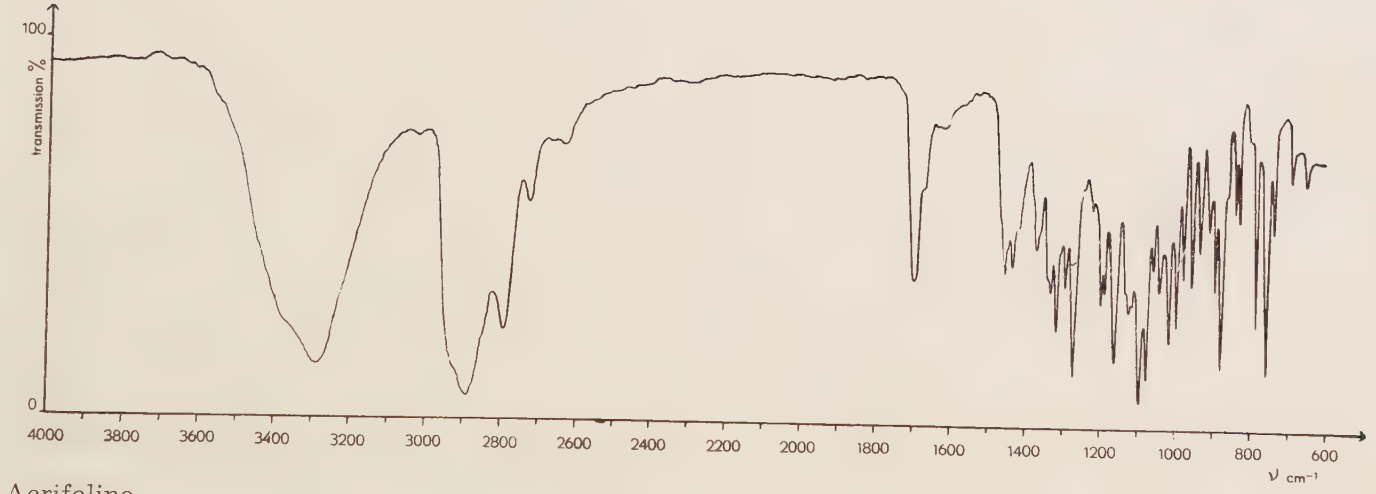

Dihydrolycopodine

FIG. 22. — *Spectre I.R.*



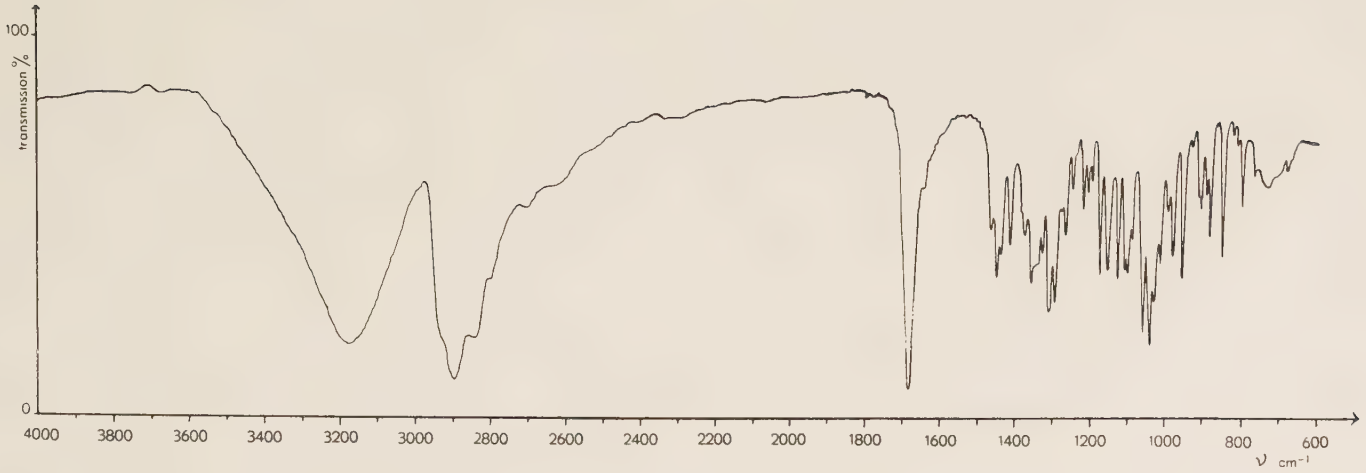

Annotinine

FIG. 23. — *Spectre I.R.*



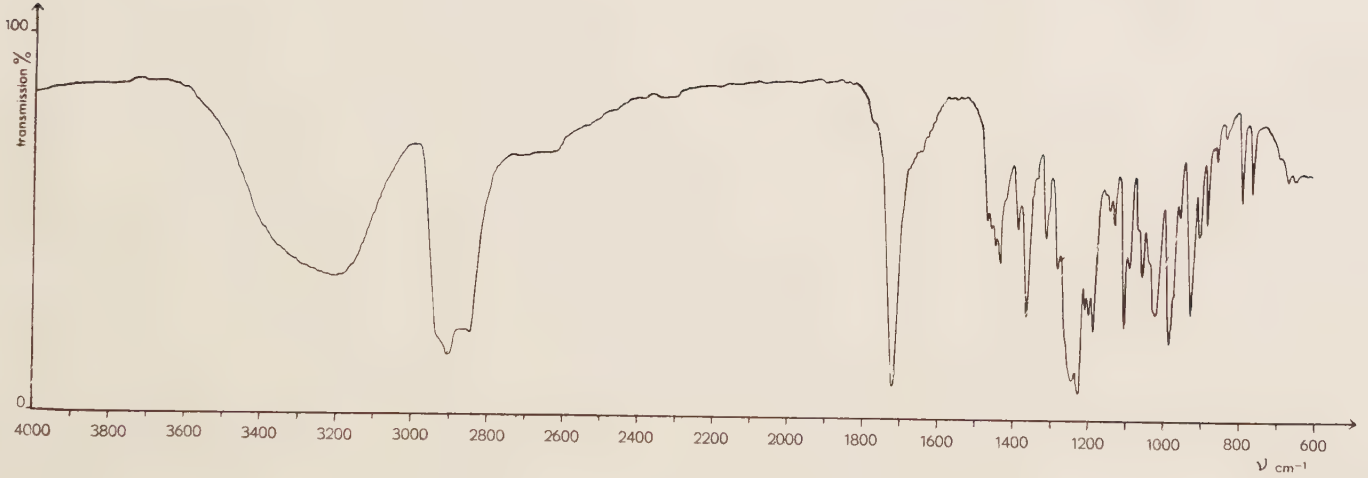

Acrifoline

FIG. 24. — *Spectre I.R.*



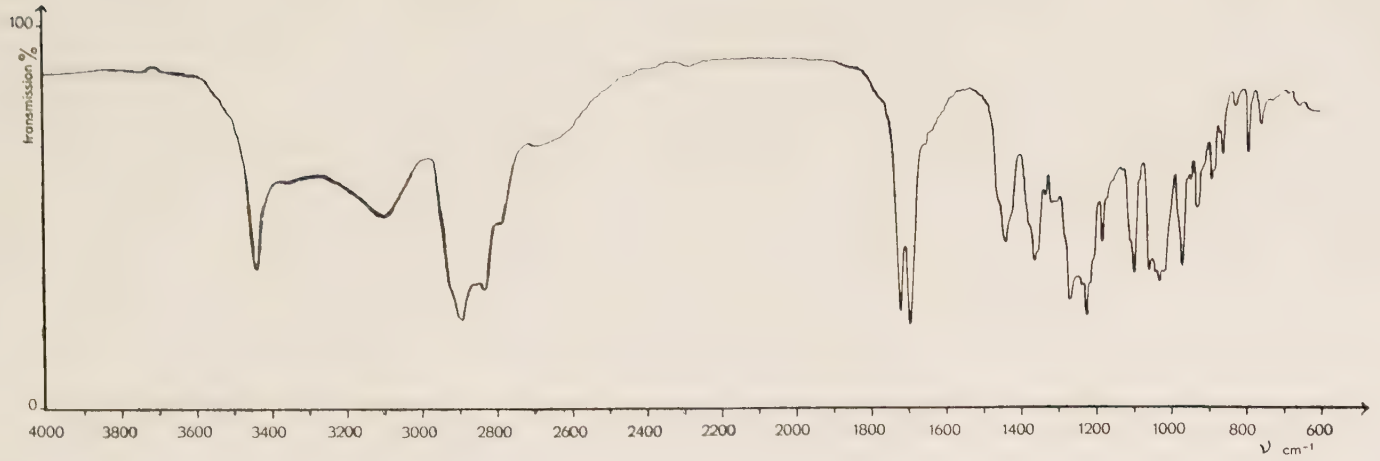

Clavolonine

FIG. 25. — *Spectre I.R.*



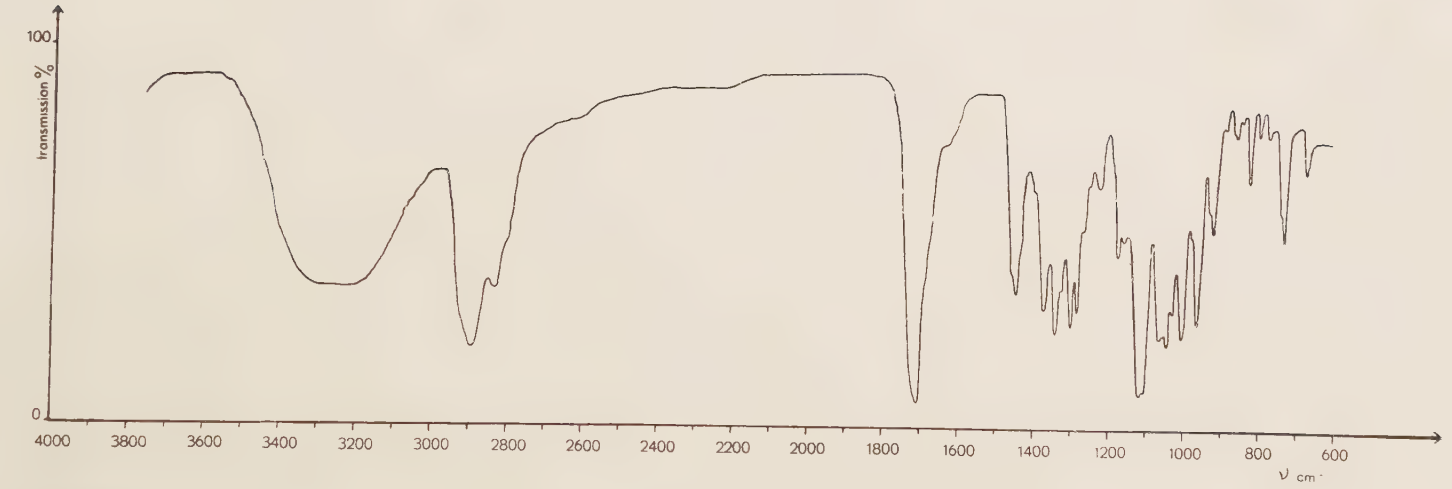

*a* lofoline

FIG. 26. — *Spectre I.R.*



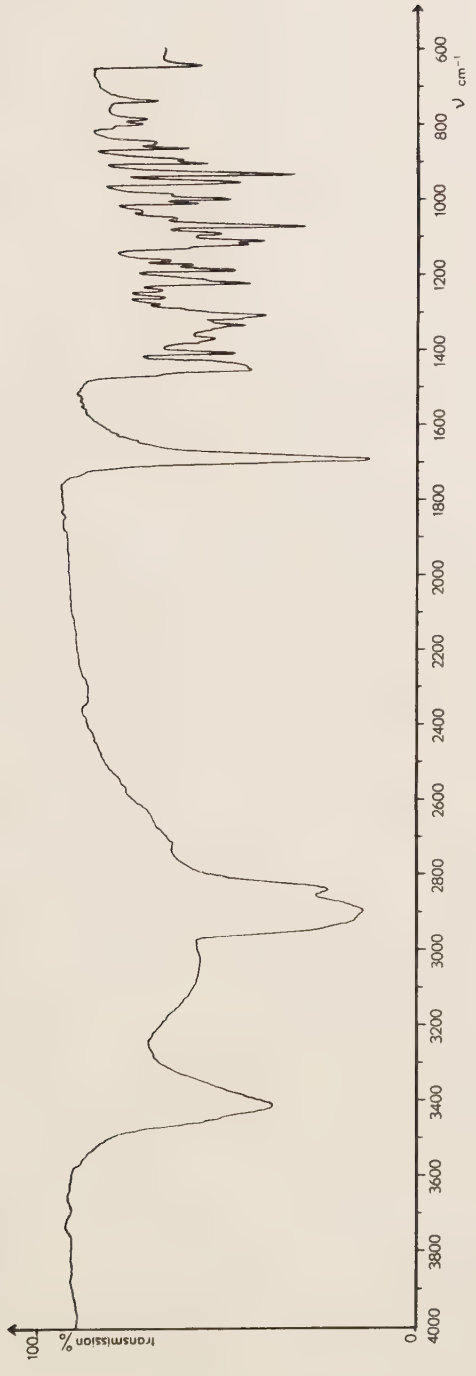

β lofoline

FIG. 27. — *Spectre I.R.*



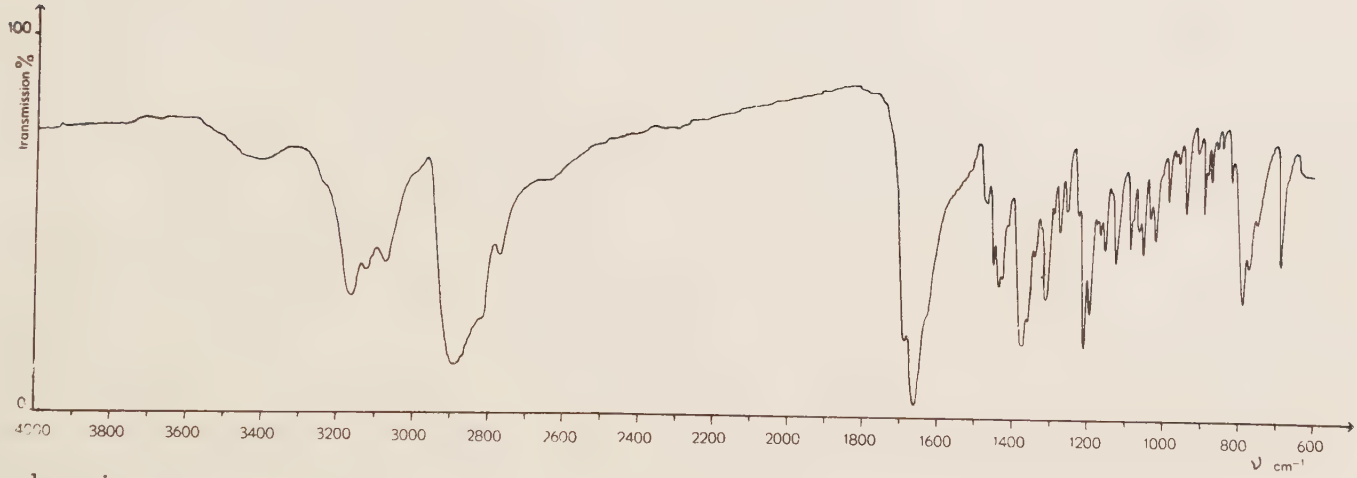

Annotine

FIG. 28. — *Spectre I.R.*



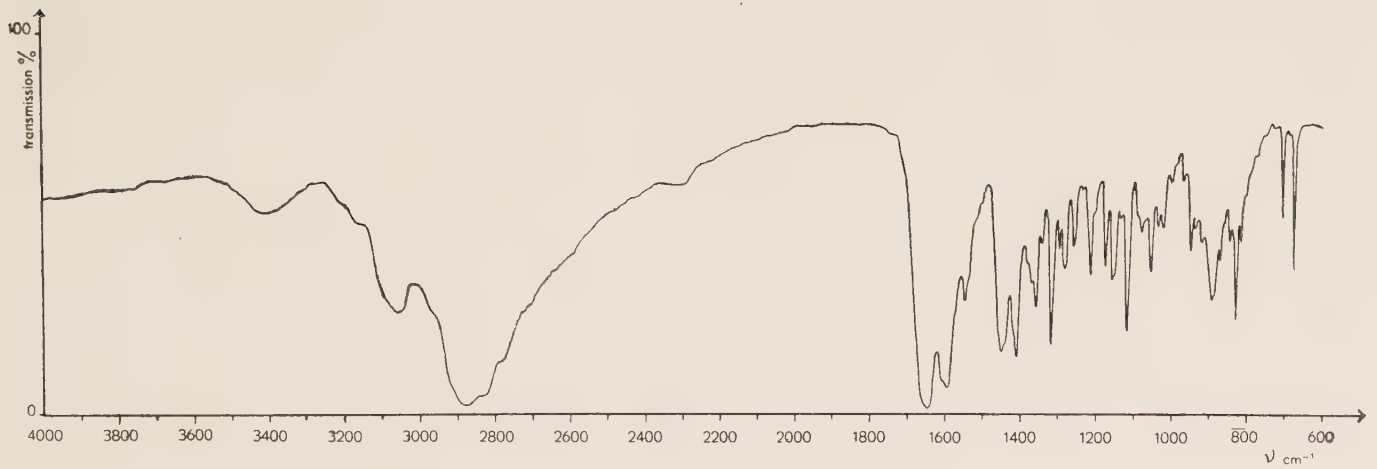

Clavatine

FIG. 29. — *Spectre I.R.*




α obscurine

FIG. 30. — *Spectre I.R.*




β obscurine

FIG. 31. — *Spectre I.R.*

## 5° CONCLUSIONS

Nous avons ainsi mis en évidence dans *Lycopodium phlegmaria* L. onze alcaloïdes différents.

L'alcaloïde A, proportionnellement le plus important, suivi des alcaloïdes B, C, E et F, G et H ; enfin, les alcaloïdes D, I, J et K existant en très faible quantité.

La comparaison des données fournies par la chromatographie ($R_F$—$\Delta R_M$), par l'électrophorèse, par les spectres U.V. et I.R. permet de tirer les conclusions suivantes :

1. L'alcaloïde C est bien identique à la lycopodine. Il n'est nullement étonnant de retrouver ici un alcaloïde presque constamment présent dans la plupart des espèces de lycopodes étudiés jusqu'à ce jour ;

2. L'alcaloïde F est extrêmement voisin de l'alcaloïde L 8 (isolé la première fois dans *Lycopodium annotinum*) ;

3. Il est possible que l'alcaloïde K soit identique à la lycopodine, mais la certitude n'en est pas établie ;

4. Les autres alcaloïdes sont différents :

   a) des alcaloïdes de référence étudiés,

   b) de la lycofoline et de l'annofoline (d'après la comparaison des spectes I.R.).

   Il n'est pas possible évidemment d'affirmer qu'ils sont de nouveaux corps tant qu'ils n'auront pas été comparés aux alcaloïdes de lycopodes déjà isolés (il ne faut pas oublier qu'il en existe une soixantaine).

   Il est probable que les alcaloïdes E, F et J sont voisins les uns des autres et ils doivent posséder un squelette proche de celui de la lycopodine. Tous trois montrent une fonction C=O et de faibles associations OH, comme la lycopodine.

   L'alcaloïde A possède également au moins une fonction C = O et une ou plusieurs fonctions OH ou NH marquées par de très fortes associations.

   L'alcaloïde B doit posséder une fonction C = O différente des alcaloïdes précédents (nette différence du spectre U.V. et du spectre I.R.) et il est probable qu'il possède une ou plusieurs doubles liaisons ;

5. Les alcaloïdes D, G, H et I n'ont pas été étudiés faute de quantité suffisante de substance.

TROISIÈME PARTIE

# Activité physiologique de Lycopodium Phlegmaria L.

# TRAVAUX ANTÉRIEURS

L'activité physiologique des lycopodes semble avoir été beaucoup moins étudiée que leur composition chimique.

Les premiers travaux signalés sont ceux d'Arata et Canzoneri (10), puis ceux de Dominguez (32), qui ont montré que la « pillijanine » (*), tirée de *Lycopodium saururus* (appelé « pillijan » en Amérique du Sud) est toxique pour le Chien et mortelle à la dose de 0,1 à 0,2 g : « elle tue le Chien avec les symptômes de la paralysie du muscle cardiaque. Son introduction dans l'œil provoque la contraction de la pupille » (5). En Amérique du Sud, le « pillijan » serait utilisé comme purgatif et abortif.

Muszynski (63) a montré que la « sélagine » possède la même propriété de contracter la pupille. Il n'en est pas de même avec les autres alcaloïdes isolés de *Lycopodium annotinum* (« annotinine »), *Lycopodium clavatum* (« clavatine »), *Lycopodium complanatum* (« complanatine ») et *Lycopodium inundatum* (« inundatine »). D'après cet auteur, l'action, sur la Grenouille, de l'infusé aqueux de différentes espèces de *Lycopodium* consiste en une paralysie des nerfs moteurs, comparable à celle obtenue avec le curare. Elle apparaît après 15 à 30 minutes et persiste 36 heures. A dose plus importante, elle peut même provoquer la mort par asphyxie.

Oficjalski (65) a poursuivi l'étude sur Chats, Lapins, Rats et Grenouilles : il utilise les alcaloïdes de *Lycopodium* sous forme de sulfites solubles en injection sous-cutanée. Il a observé également chez les Grenouilles des états de paralysie complète pouvant persister plusieurs jours, mais les animaux ont ensuite récupéré. La « sélagine » serait dix fois plus active que les autres substances.

Parmi les homéothermes, le Chat est le plus sensible ; viennent ensuite le Lapin et le Rat. Les doses susceptibles de provoquer des signes d'intoxication varient considérablement (de 5 mg à 1 g par kg) suivant l'alcaloïde et l'espèce animale. Des doses deux fois et demie supérieures sont mortelles.

(*) Les noms entre guillemets représentent le bloc alcaloïdique et non des substances pures.

L'auteur range les alcaloïdes alors connus en deux groupes de toxicité différente.

Les symptômes d'intoxication signalés sont les suivants : cris, inquiétude, vomissements et salivation, mort au bout d'une heure à deux heures et demie avec convulsions toniques et cloniques et asphyxie. Souvent l'animal élimine des fèces et de l'urine.

L'autopsie de ces animaux démontre une hyperémie des poumons, de l'estomac et de l'intestin, qui est le plus souvent vide de son contenu.

En 1948, Muszynski (64) relate l'hospitalisation d'une femme à Vilna, empoisonnée par un infusé de 3 à 4 g de *Lycopodium selago* (utilisé en traitement externe contre les poux).

Il essaye sur lui-même l'activité de la « complanatine », de l' « annotine » et de la « sélagine ». Si, à la dose de 0,1 g, les deux premières substances agissent peu, la troisième, par contre, provoque des sueurs, des vomissements, une baisse du pouls à 64, une sensation de faiblesse, des spasmes et des frissons des muscles des mains, qui persistent jusqu'au lendemain, ainsi que la contraction de la pupille.

Il en conclut à la plus grande toxicité des Lycopodes du groupe *Urostachya*.

Aucune des publications précédentes ne concerne *Lycopodium phlegmaria* et nous n'avons pas trouvé de travaux plus récents dans ce domaine.

# TRAVAUX PERSONNELS

Pour faire une investigation aussi large que possible des activités physiologiques de *Lycopodium phlegmaria* L., nous avons décomposé notre travail dans ce domaine en trois parties :

1. Etude de la symptomatologie sur diverses espèces animales : Grenouilles, Souris, Cobayes et Lapins. Détermination de la D.L. 50 sur Souris.

2. Effets physiologiques sur l'animal entier et sur des organes isolés.

3. Etude chez l'animal des répercussions biochimiques induites par la drogue, administrée sous la forme la plus proche de celle utilisée par l'homme.

## ETUDE TOXICOLOGIQUE

### A. — SYMPTOMATOLOGIE DE L'INTOXICATION DES DIVERSES ESPECES ANIMALES

**1. — Action sur la Grenouille** (des alcaloïdes totaux) :

Nous avons utilisé pour l'expérimentation une solution d'*alcaloïdes totaux* dans du sérum physiologique à 5 mg/ml. Elle détermine, après six minutes, à la dose de 0,8 ml, un ralentissement des mouvements et l'animal ferme les yeux. Après un quart d'heure, il y a une paralysie des membres et la Grenouille retournée reste sur le dos. Vingt minutes après l'injection, elle est en état de mort apparente et cet état persiste vingt-quatre heures.

Nos résultats sont donc en complet accord avec ceux d'Oficjalsky que nous signalions ci-dessus.

**2. — Action sur la Souris :**

Nous avons étudié la toxicité de la drogue sous plusieurs formes et nous avons essayé successivement l'infusé, la teinture alcoolique concentrée (après élimination de l'alcool) et les alcaloïdes bruts obtenus à partir de cette teinture.

a) *infusé de Lycopodium plegmaria L. (voie orale)* :

L'infusé a été préparé à partir de la poudre de plante entière, dans les conditions suivantes : un poids p de poudre est traité par un poids d'environ 2 p d'eau bouillante. Après expression, le poids de liquide est ramené à p.

L'administration est effectuée sur la Souris à jeun.

La symptomatologie de l'intoxication, produite par des doses correspondant à des quantités de drogue séche comprises entre 60 et 120 g/kg d'animal, est la suivante :

Environ dix minutes après l'ingestion, l'animal est oppressé, dyspnéique, des mucosités nasales apparaissent, il se met en boule le poil hérissé ; des sécrétions abondantes s'épanchent sur les yeux et les recouvrent d'une taie blanchâtre ; d'autre fois (en général pour de plus fortes doses) il se produit une exophtalmie prononcée. Simultanément, s'observe une évacuation d'urine et de selles glaireuses tachant le papier.

Parfois, des crises convulsives secouent violemment l'animal. Après cette phase clonique, des convulsions toniques brèves conduisent à la mort.

Il est à remarquer que plus l'évacuation intestinale est abondante, plus, semble-t-il, les chances de survie sont fortes.

b) *teinture obtenue par lixiviation alcoolique de la drogue (voie intrapéritonéale)* :

Cette teinture a été ramenée à son poids de départ par évaporation sous vide, à température inférieure à 40 °, qui permet l'élimination de toute trace d'alcool sans altérer la drogue.

Les symptômes de l'intoxication, provoquée par des doses correspondant à des quantités de drogue sèche comprises entre 18 et 26 g/kg d'animal, sont voisins de ceux qui apparaissent avec l'infusé par voie orale. Ils sont seulement plus intenses, ce qui est une conséquence du changement du mode d'administration : phénomènes convulsifs plus violents (spasmes, hoquets), exophtalmie plus prononcée.

La mort survient en général dans la première demi-heure, souvent dans les quinze premières minutes, plus précoce que dans les essais précédents.

c) *bloc alcaloïdique (voie intrapéritonéale)* :

Les alcaloïdes isolés à partir de la drogue ont été mis en solution dans du sérum physiologique et administrés par voie intrapéritonéale, à des doses variant de 25 à 55 mg/kg. Nous avons constaté des phénomènes voisins de ceux précédemment décrits

pour les autres formes d'administration. Deux faits, cependant, méritent d'être signalés :

1) l'évacuation intestinale est beaucoup moins intense ;

2) dans d'assez nombreux cas, il apparaît une vaso-dilatation avec rougeur très nette des extrémités (queue, pattes, museau).

L'issue fatale intervient en général dans les trente premières minutes, souvent dans les dix à quinze minutes suivant l'injection (à peu près dans le même temps que pour les traitements avec la teinture alcoolique). Dans les heures qui suivent, les issues mortelles sont plus rares qu'elles ne l'étaient lors des essais effectués avec la teinture.

**3. — Action sur le Cobaye :**

Nous avons étudié l'action de l'infusé, préparé comme indiqué ci-dessus. Il est administré par gavage, au moyen d'une sonde gastrique.

Plusieurs animaux ont été traités à des doses variant de 60 à 30 g de plante sèche par kilo d'animal. Dans ces limites les symptômes sont à peu près les mêmes. Après quinze minutes environ, l'animal éprouve de la gêne respiratoire. Il y a évacuation de selles qui prennent peu à peu consistance pâteuse. Dans certains cas, des mucosités nasales apparaissent ; il peut être saisi de tremblements et démontrer une exophtalmie. Il se traîne ensuite sur l'abdomen, pattes postérieures étendues et flasques, se couche et meurt. Les animaux qui résistent récupèrent après un ou deux jours.

En traitant des Cobayes femelles qui se trouvaient gravides, nous avons provoqué l'élimination du fœtus, ce qui correspond aux propriétés abortives attribuées à des Lycopodes en Amérique du Sud.

**4. — Action sur le Lapin :**

*Infusé.* — Il a fallu faire ingérer au Lapin, par fractions espacées d'une à deux heures, une quantité d'infusé correspondant à 40/60 g de drogue sèche par kilo d'animal pour obtenir les premiers signes d'intoxication : l'animal se met en boule, est atteint d'une légère exophtalmie et émet des selles liquides. Il se rétablit fort bien.

*Alcaloïdes totaux.* — Nous avons fait plusieurs essais d'injection intraveineuse des alcaloïdes en solution (environ 5 mg d'alcaloïdes par kilo d'animal). Le Lapin, qui après cinq minutes manifeste déjà une certaine inquiétude, se met à dodeliner de la tête vingt minutes plus tard puis se ramasse sur ses pattes postérieures. Parfois, également, il se traîne sur l'abdomen. Mais il n'y a pas d'agressivité nette à cette dose.

## B. — DETERMINATION DES DOSES TOXIQUES

La détermination de la toxicité aiguë a été effectuée sur la Souris. Les diverses préparations galéniques utilisées ont déjà été décrites précédemment. Elles ont permis d'étudier la toxicité soit par voie orale, soit par voie parentérale. La mortalité est décomptée après 24 heures. Les animaux traités qui survivent à la première période d'intoxication sont maintenus cependant en observation afin de mieux préciser tous les éléments de cette agressivité.

1) *Toxicité de l'infusé administré par voie orale :*

Il n'a pas été possible de dépasser un pourcentage de mortalité de 50 %. La dose ne pouvait être augmentée, compte tenu de la capacité stomacale de la Souris ; d'autre part, l'élimination fécale semble augmenter parallèlement à la quantité de drogue ingérée, ce qui facilite pour l'animal l'évacuation des principes toxiques.

Le tableau suivant résume l'expérimentation et montre que la D.L. 50 paraît se situer au voisinage de 100 g de plante sèche par kilo.

| Série | Quantité d'infusé en g/kg (ramené au poids de drogue sèche) | Nombre de Souris | Nombre de morts en 24 h. | Mortalité |
|---|---|---|---|---|
| A | 50 | 10 | 0 | 0 % |
| B | 60 | 10 | 2 | 20 % |
| C | 75 | 10 | 4 | 40 % |
| D | 100 | 10 | 5 | 50 % |
| E | 120 | 10 | 5 | 50 % |

Quelques essais de toxicité de l'infusé par voie intrapéritonéale ont été également effectués. Les résultats sont comparables à ceux obtenus avec la teinture alcoolique (voir ci-après).

2) *Toxicité de la teinture alcoolique :*

L'étude, effectuée par administration parentérale à une cinquantaine de Souris, est résumée dans le tableau ci-dessous.

La courbe de Trévan (fig. 32) nous situe la D.L. 50 au voisinage de 23 g de drogue sèche par kilo de Souris.

| Série | Quantité d'infusé en g/kg (ramené au poids de drogue sèche) | Nombre de Souris | Nombre de morts en 24 h. | Mortalité |
|---|---|---|---|---|
| A | 18 | 10 | 2 | 20 % |
| B | 22 | 10 | 4 | 40 % |
| C | 24 | 10 | 6 | 60 % |
| D | 26 | 8 | 6 | 75 % |

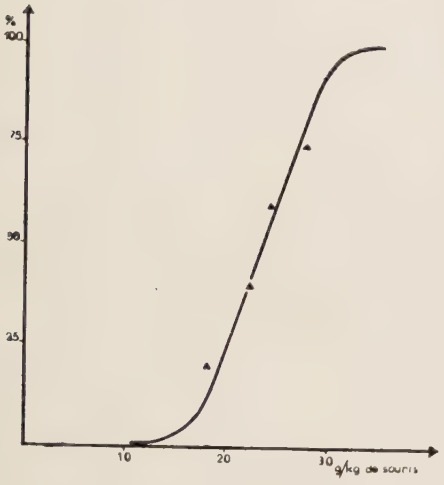



FIG. 32. — *Teinture*

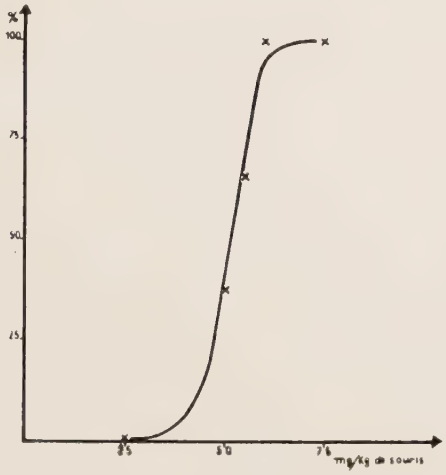



FIG. 33. — *Alcaloïdes*

3) *Toxicité du bloc alcaloïdique :*

Nous pouvons voir (cf. tableau ci-dessous, et courbe de Trévan) (fig. 33) que la D.L. 50 se situe aux environs de 50 mg par kilo, avec une administration par voie parentérale.

| Série | Quantité d'infusé en g/kg (ramené au poids de drogue sèche) | Nombre de Souris | Nombre de morts en 24 h. | Mortalité |
|---|---|---|---|---|
| A | 25 | 4 | 0 | 0 % |
| B | 50 | 8 | 3 | 37 % |
| C | 55 | 9 | 6 | 70 % |
| D | 60 | 10 | 10 | 100 % |
| E | 75 | 7 | 7 | 100 % |

Le pourcentage des alcaloïdes dans le matériel utilisé pour l'expérimentation animale étant environ de 0,25 %, la correspondance des valeurs de D.L. 50 pour les diverses préparations de Lycopodes semble permettre de conclure que la toxicité de cette drogue ressort essentiellement, et de façon presque exclusive, de sa richesse en alcaloïdes.

D'ailleurs des essais comparatifs effectués avec des préparations de Lycopodes privées d'alcaloïdes confirment cette hypothèse.

## 2° EFFETS PHYSIOLOGIQUES DE *LYCOPODIUM PHLEGMARIA* L.

### A. — ESSAIS SUR LAPIN

L'animal est préparé selon les techniques classiques de physiologie expérimentale :

— anesthésie à l'uréthane (1g/kg Lapin, voie intrapéritonéale) ou au pentobarbital (25 mg/kg, voie intraveineuse) ;

— enregistrement de la pression carotidienne par le kymographe de Ludwig ;

— enregistrement des mouvements respiratoires par canule intratrachéale.

#### 1. Effets respiratoires :

L'administration intraveineuse de l'infusé de *Lycopodium phlegmaria* L., amené à un pH aussi voisin que possible de 7, provoque rapidement une réponse respiratoire.

Le bloc alcaloïdique séparé, administré dans les mêmes conditions, ne produit pas de semblable polypnée. Des essais de contrôle ont été effectués avec des solutions témoins de même pH pour éliminer toute influence de ce facteur et ont donné des résultats négatifs, comme nous l'espérions.

**2. Effets tensionnels :**

Le fléchissement léger et transitoire de la pression carotidienne, apparaissant à l'injection intraveineuse de l'infusé ne revêt qu'une signification réduite, car ce fait est habituel après toute injection d'extrait végétal.

Pour être pris en considération, il demandait à être confirmé par l'essai des principes actifs de la drogue, le bloc alcaloïdique en particulier.

Les alcaloïdes en solution dans le sérum physiologique provoquent une hypotension assez notable (fig. 34). La pression carotidienne fléchit de 4 cm de Hg en 10 secondes à peine après le début de l'injection intraveineuse (pratiquée en 35 secondes) de 20 mg d'alcaloïdes totaux.

Cette réponse est fugace, puisque la pression s'est rétablie 10 secondes après la fin de l'injection. Il n'y a pas de modification manifeste du rythme cardiaque. L'hypotension paraît devoir relever d'un facteur vasomoteur. Ce fait est à rapprocher de l'observation que nous avons présentée ci-dessus dans la symptomatologie de l'intoxication par les alcaloïdes isolés (vasodilatation avec rougeur sensible aux extrémités).

Il ne semble pas, à cette dose, que les alcaloïdes soient de sévères excitants bulbaires, car il n'y a pas d'effet de brachycardie ou de polypnée.

**3. Action sur le système nerveux central :**

L'utilisation faite par les indigènes de *Lycopodium phlegmaria* L. (qu'ils considèrent comme un excitant) et les observations de l'étude toxicologique nous ont incité à étudier l'action de ce Lycopode sur le système nerveux central.

Pour évaluer une action stimulante, il convenait de déprimer tout d'abord l'activité centrale.

L'action dépressive de la morphine sur les régions corticales et bulbaires peut être mise à profit pour la réalisation d'une telle étude.

Nous avons, dans une première phase, administré au Lapin, par voie sous-cutanée, une dose de morphine de 2 cg/kg : après quelques instants, la respiration commence à se ralentir. Sans attendre une trop grande dépression, avant que la morphine manifeste sa toxicité, nous avons injecté, par voie intraveineuse : 1 ml de l'infusé, correspondant à 1 g de drogue sèche. La réaction respiratoire est très nette : le rythme est passé de 7 à 11 par 10 secondes. Ultérieurement, alors que l'effet persiste encore, une deuxième injection de 1 ml accélère encore la respiration : de 11 à 16 en 10 secondes (fig. 35).

L'effet excitant bulbaire de l'infusé est ainsi établi.

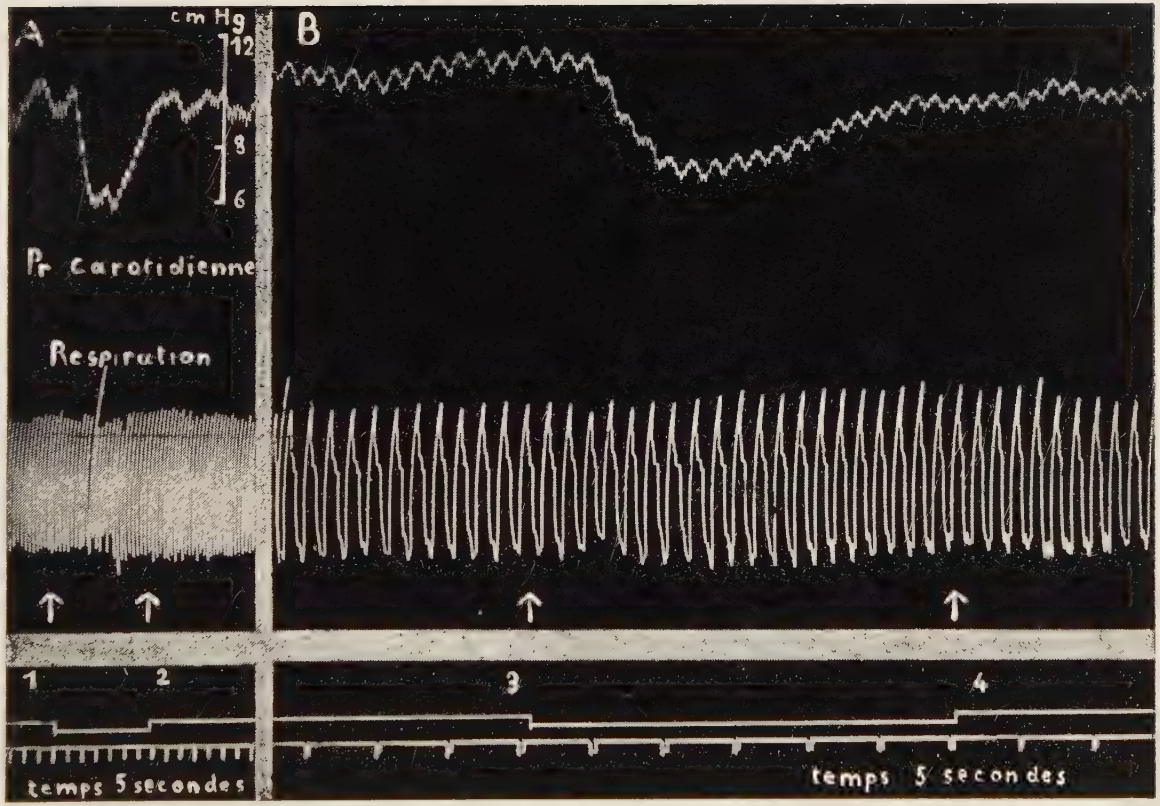



FIG. 34. — *Action de* Lycopodium phlegmaria *L. (alcaloïdes totaux) sur Lapin anesthésié*

↑ ↑
(1 2) injection intraveineuse de 8 mg/kg d'alcaloïdes
↑ ↑
(3 4) renouvellement de l'injection

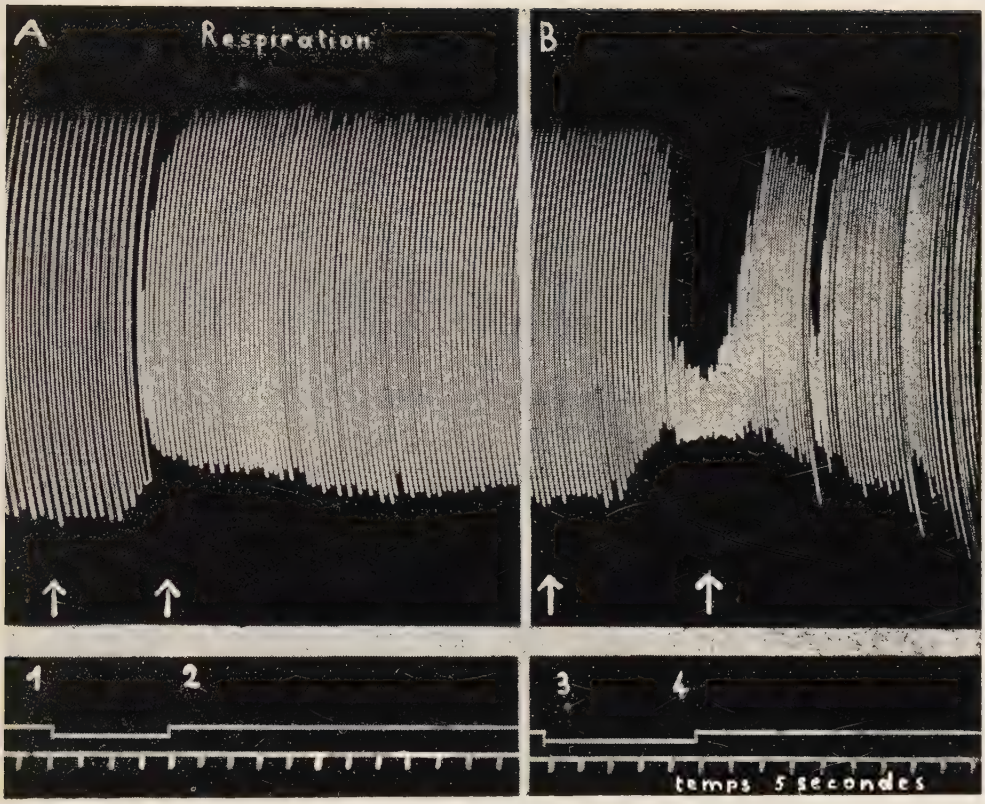



FIG. 35. — *Action de* Lycopodium phlegmaria *L. (infusé) sur Lapin dont la respiration a été au préalable déprimée*

En A (1 2) injection intraveineuse d'un ml d'infusion (0,43 g de drogue sèche/kg) : accélération de la respiration.

En B (3 4) injection renouvelée : polypnée plus intense du fait de la persistance de la période réactionnelle précédente.

## B. — ETUDE SUR CŒUR DE GRENOUILLE IN SITU

**Technique :**

1. *Préparation de l'animal.*

Après destruction du cerveau et de la moelle, l'animal est fixé sur le dos, à une planchette en liège. La peau est incisée sur la ligne médiane du thorax et on détache le plastron sternal. Le péricarde est ensuite délicatement ouvert et la pointe du cœur mise à nu est soulevée par une serre-fine reliée à un stylet inscripteur qui trace le cardiogramme sur un tambour enregistreur.

2. *Administration de la drogue.*

On peut soit déposer directement goutte à goutte la solution à essayer sur le cœur de l'animal, soit injecter une certaine quantité de produit dans le sac lymphatique. Nous avons utilisé successivement les deux méthodes.

**Résultats expérimentaux :**

1. *Action directe sur le cœur.*

a) de l'infusé de *Lycopodium phlegmaria* L. :

La réponse, malgré des variations de sensibilité suivant la préparation animale, se manifeste souvent pour des doses de 1 à 2 gouttes d'infusé (correspondant à 50 à 100 mg de drogue sèche) et est très nette pour des doses supérieures (fig. 36 et 37).

Elle consiste en un effet chronotrope négatif immédiat et un effet inotrope également négatif, qui se manifeste après quelques secondes. L'analyse détaillée du cardiogramme démontre une modification de la systole auriculaire dont l'ampleur diminue peu à peu jusqu'à être très réduite, et ne laisser apparente et efficace que la systole ventriculaire qui, elle aussi, subit, mais avec moins d'intensité et moins précocement, cette modification. L'arythmie se manifeste d'ailleurs à la fin de l'intoxication, de longues poses diastoliques succédant à des salves de systoles ventriculaires bigéminées.

L'intoxication sévère du myocarde provoque l'arrêt en diastole.

b) des alcaloïdes totaux :

Les effets sur le cœur in situ de Grenouille sont comparables à ceux provoqués par l'infusé, ce qui semble bien montrer que cette activité ressort des alcaloïdes.

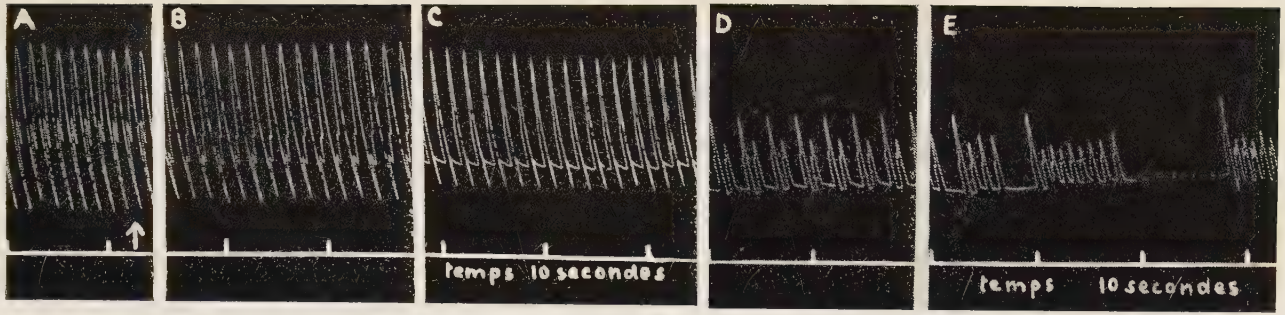



FIG. 36. — *Action directe de* Lycopodium phlegmaria *L. (infusé) sur le cœur de Grenouille in situ*

en A (▲) 3 gouttes d'infusé (= 100 mg de drogue sèche)
entre A et B 2 minutes
entre B et C 2 minutes et addition d'infusé (4 gouttes)
entre C et D 2 minutes et 1 goutte d'infusé
entre D et E 1 minute et 1 goutte d'infusé.

II

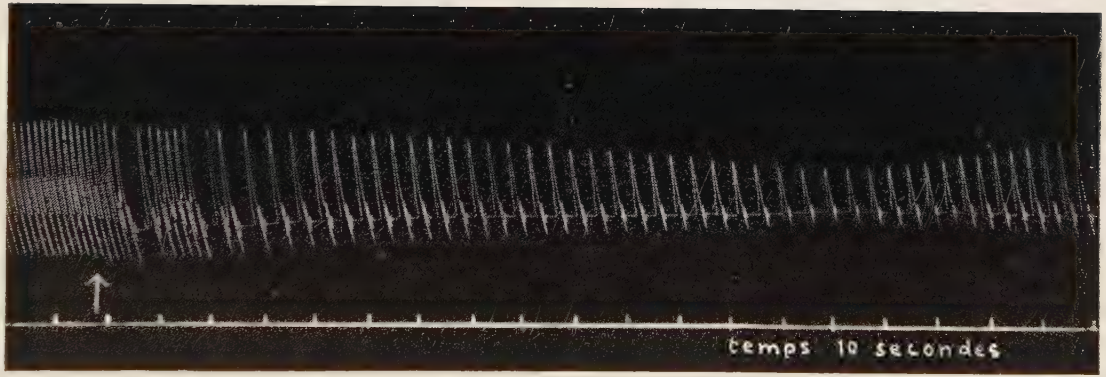



FIG. 37. — *Action directe de* Lycopodium phlegmaria *L. (infusé) sur le cœur de Grenouille in situ*

(⅄) 1 goutte d'infusé (= 30 mg de drogue)

c) de l'alcaloïde A isolé :

L'alcaloïde A isolé de la fraction correspondante du contre-courant provoque à lui seul toutes les activités décrites ci-dessus. Dans la phase terminale, la systole ventriculaire décroît considérablement en intensité, pour n'être guère plus importante que la systole auriculaire elle-même très réduite. L'intoxication altère donc l'ensemble de la contraction cardiaque (fig. 38). Il est donc responsable pour une grande part des effets cardiaques de la drogue elle-même ; il est d'ailleurs l'alcaloïde dominant quantitativement.

d) de l'alcaloïde B isolé :

Celui-ci n'a pas fourni de résultats aussi concluants. Il est vrai que nous ne disposions que de très faibles quantités de cet alcaloïde mineur ; il paraît de toute façon beaucoup moins actif.

e) de la fraction éthérée isolée (cf. p. 42) :

Quelques essais limités permettent de reconnaître à cette fraction que nous n'avons isolée qu'en faible quantité une activité cardiaque assez réduite : dans les conditions de nos recherches, il est cependant apparu une nette action chronotrope négative mais fugace, susceptible de se renouveler à chaque addition de préparation. Cependant, les difficultés d'extraction ne nous autorisent pas à des conclusions plus précises car l'élimination des dernières traces d'alcaloïdes de cette fraction est très délicate.

f) du distillat de l'infusé :

La partie volatile de l'infusé, qui s'est révélée contenir des traces d'alcaloïdes, a été appliquée à la préparation cardiaque et ses effets, bien que discrets, sont qualitativement identiques à ceux des préparations précédentes.

Dans un but éventuel d'identification, ils ont été comparés à ceux provoqués par un alcaloïde de référence : la nicotine, dont une solution diluée aqueuse a été également distillée. Les effets cardiaques de celle-ci sont suffisamment différents pour ne pas laisser supposer la présence de cette substance en quantité valable dans notre distillat de lycopode.

2. *Action produite par injection dans le sac lymphatique.*

a) de l'infusé :

Une injection de 2 ml d'infusé (préparé à partir de 2 g de drogue sèche) produit des effets cardiaques manifestes mais avec

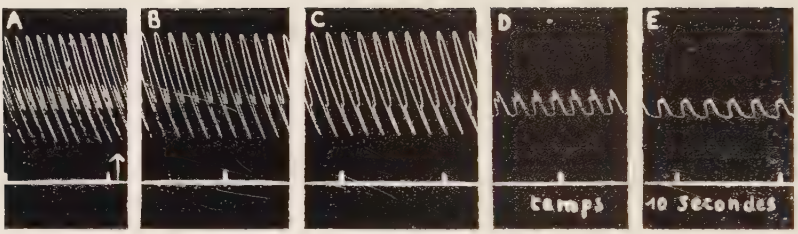



FIG. 38. — *Action directe de l'alcaloïde A sur le cœur de Grenouille in situ*

entre B et C 0,5 mg d'alcaloïde A — de B à C 2 minutes
entre C et D 5 mg d'alcaloïde A — de C à D 15 minutes
de D à E 5 minutes

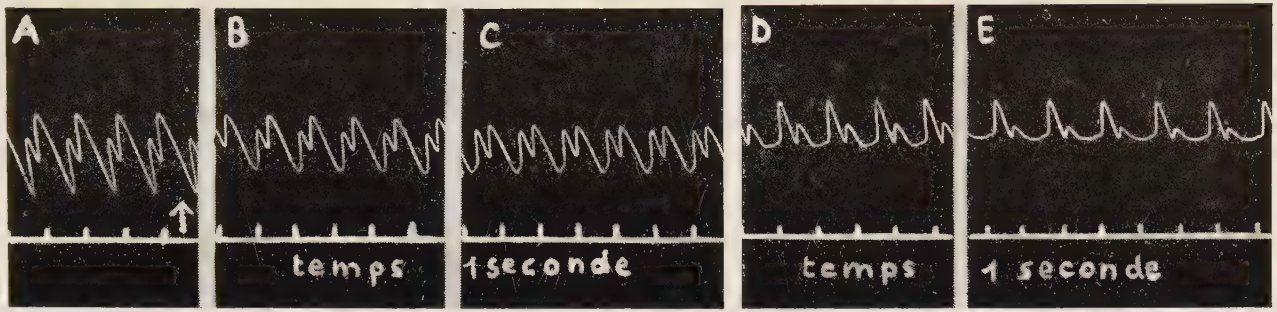



FIG. 39. — *Action de* Lycopodium phlegmaria *L. (infusé) sur la Grenouille par injection dans le sac lymphatique*

en A (⅄) 2 ml d'infusé (provenant de 2 g de drogue sèche)

de A à B 5 minutes
de B à C 6 minutes
de C à D 21 minutes
de D à E 13 minutes

un temps de latence accru et avec moins d'intensité que dans les cas précédents. Nous notons, dans l'un des essais effectués (fig. 39), une réduction particulièrement nette de la systole ventriculaire, au fur et à mesure que l'intoxication s'accuse.

b) des alcaloïdes totaux :

L'activité produite par ceux-ci est du même ordre que celle de l'infusé, confirmant les résultats obtenus.

## C. — ETUDE SUR INTESTIN ISOLE DE RAT

**Technique :**

Les animaux, à jeun depuis la veille, sont sacrifiés par section des carotides. Une portion du duodenum est prélevée aussitôt entre deux ligatures espacées de 1,5 à 2 cm. Ainsi montée entre deux fils fins, la préparation est portée dans une solution de Tyrode oxygénée et maintenue à 38°, dans la cuve à organes isolés.

Le fragment est relié à un myographe inscrivant les contractions intestinales sur un cylindre enregistreur.

**Résultats expérimentaux :**

1. *Action de l'infusé.*

Nous avons effectué une vingtaine d'essais avec des quantités différentes d'infusé correspondant à des doses variant de 0,1 à 2 g de drogue sèche. Les résultats constants consistent en une contraction très nette et souvent intense de l'anse intestinale. Elle conserve cependant et même accroît en général considérablement ses mouvements péristaltiques qui prennent alors une grande amplitude. Ce péristaltisme est beaucoup plus régulier qu'il ne l'était avant l'administration de l'infusé, mais le niveau de décontraction se situe toujours nettement au-dessus de celui observé dans la phase témoin (fig. 40). Cet effet est durable, mais réversible : après lavage, l'intestin retrouve son état premier.

Nous avons constaté que cet effet de la drogue est reproductible plusieurs fois (jusqu'à 6 fois) sur le même fragment intestinal. Il ne semble donc pas qu'il y ait d'effet toxique ou d'accumulation.

L'anse intestinale déjà soumise à l'action de l'infusé et en état d'hypermotilité répond normalement à l'administration d'adrénaline (relâchement) (fig. 41).

L'atropine provoque aussi la décontraction de l'organe en phase réactionnelle. Une nouvelle addition de préparation de Ly-

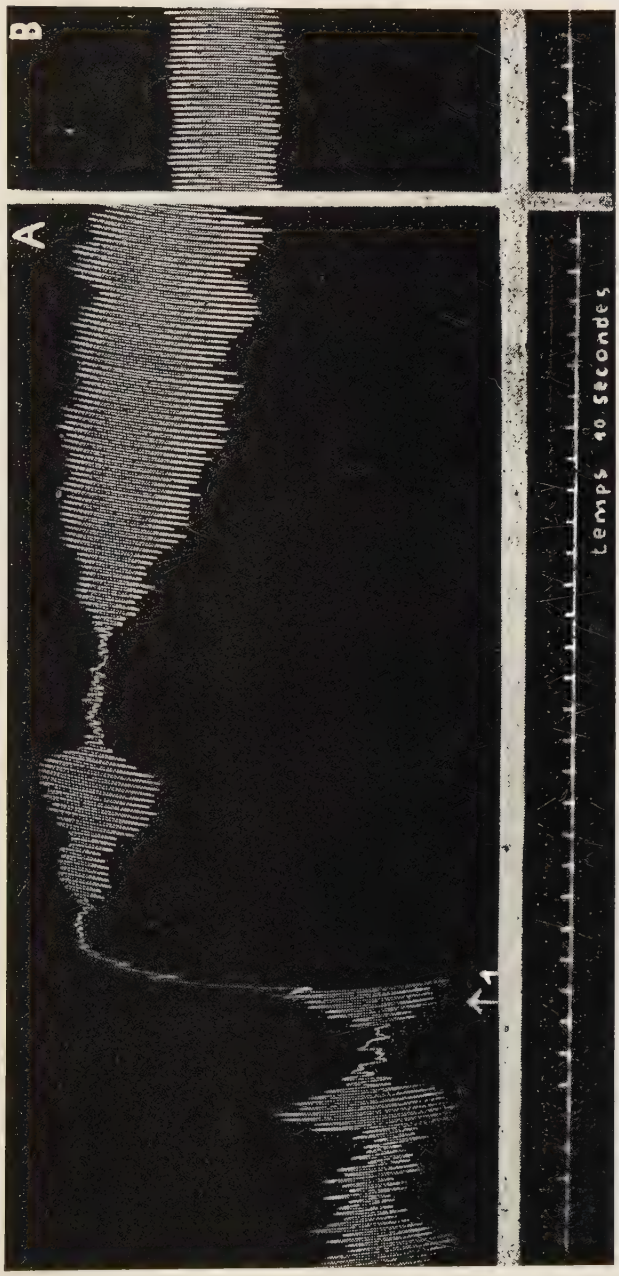



FIG. 40. — *Action sur l'intestin isolé de rat de* Lycopodium phlegmaria *L. (infusé)*

en 1 addition de l'infusé
(représentant 1 g de drogue ; concentration dans le milieu 1.10 - 2)
entre A et B 16 minutes

FIG. 41. — *Action sur l'intestin isolé de rat de* Lycopodium phlegmaria *L.* (*infusé*)

en 1 addition de l'infusé représentant 0.2 g de drogue
en 2 action de l'adrénaline (5 γ)

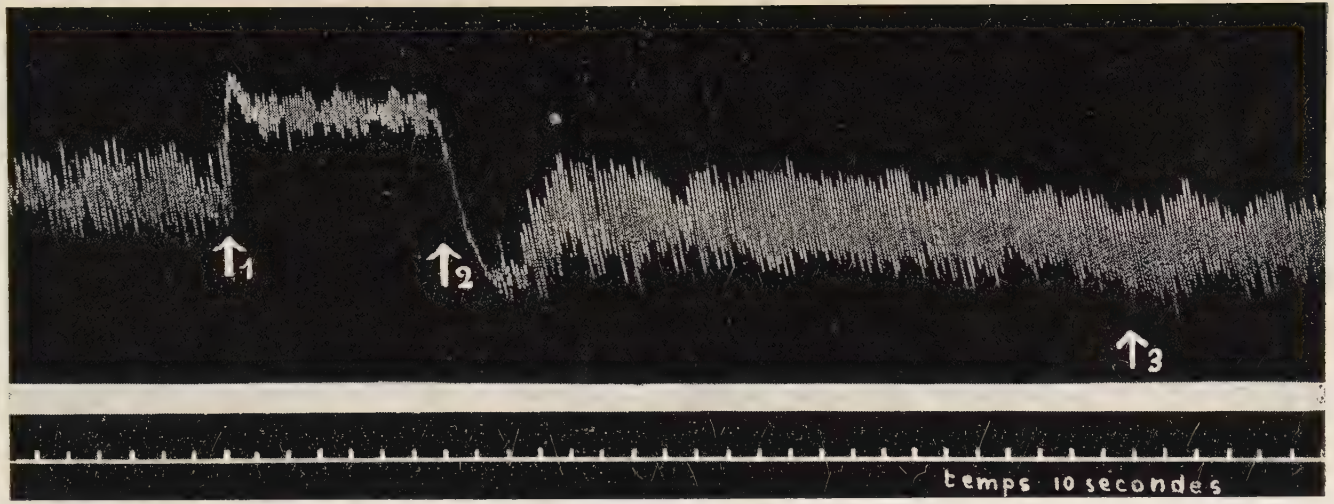



FIG. 42. — *Action sur l'intestin isolé de rat de* Lycopodium phlegmaria *L. (infusé)*

en 1 addition de l'infusé
(représentant 0,2 g de drogue : concentration dans le milieu 2.10 - 3)

en 2 action de l'atropine (10 γ)

en 3 nouvelle addition d'infusé

copode au bain renfermant cette atropine demeure sans effet (fig. 42).

L'acétyl-choline peut renforcer les effets péristaltiques de la préparation de lycopode.

2. *Action des alcaloïdes totaux :*

Nous avons réalisé une vingtaine d'essais. Les résultats sont du même ordre, mais beaucoup moins nets. Il apparaît une légèle contraction, plus atténuée, et l'amplitude des mouvements ne semble guère accrue. L'hypermotilité intestinale observée dans l'infusé n'est donc pas à rapporter aux alcaloïdes.

3. *Action du distillat de l'infusé :*

Nous avons vu qu'il contient quelques alcaloïdes volatils. Il exerce une action moins nette que l'infusé, mais supérieure à celle des alcaloïdes totaux, en ce qui concerne la contraction de l'anse intestinale. L'hypermotilité n'est pas plus accrue que dans l'action des alcaloïdes totaux.

La comparaison effectuée avec la nicotine fait ressortir pour celle-ci une action également contracturante, mais plus fugace, qui ne permet pas de conclure à la présence de celle-ci dans le distillat.

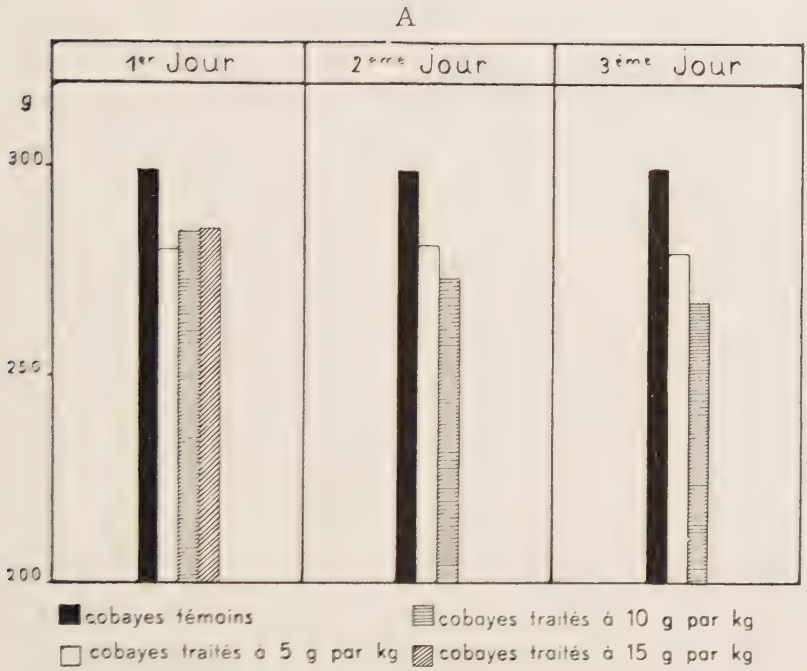
## 3° RECHERCHES BIOCHIMIQUES

Nous avons vu ci-dessus que *Lycopodium phlegmaria* L. était parfois utilisé en pays malgache, sous forme d'infusé. Il nous a paru intéressant d'essayer d'examiner les répercussions que cette absorption était susceptible de provoquer sur les divers métabolismes de l'animal, en nous plaçant dans des conditions aussi voisines que possible de son emploi habituel.

Nous rapportons ici quelques essais effectués sur Lapins et Cobayes.

### A. — ESSAIS SUR LAPINS

La drogue a été administrée quotidiennement, par tubage gastrique sous forme d'infusé, en quantité correspondant à 15 g de plante sèche par kg d'animal. Six Lapins ont été ainsi traités. Un second lot de six Lapins témoins a reçu une quantité équivalente d'eau distillée. Le traitement a été poursuivi 13 jours pour ces deux lots.



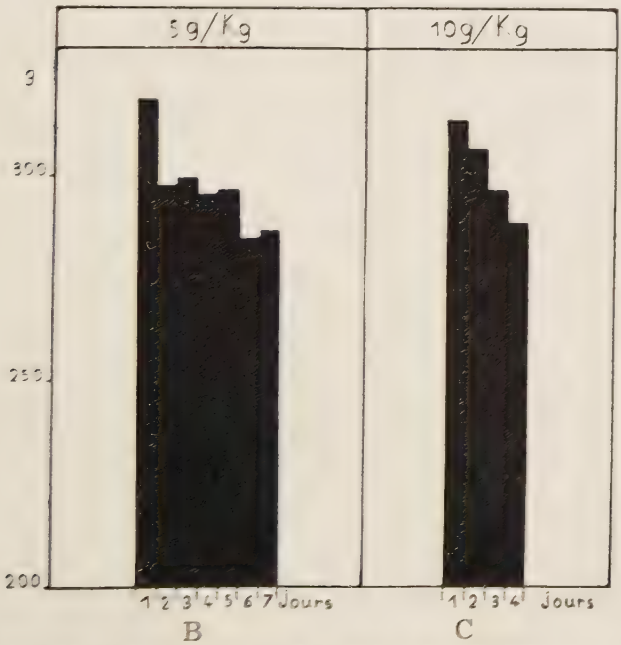




FIG. 43. — *Evolution des poids des cobayes traités*

A comparaison de quatre groupes durant les trois premiers jours
B évolution des poids d'un groupe traité à 5 g kg pendant 7 jours
C évolution des poids d'un groupe traité à 10 g kg pendant 4 jours

Nous avons effectué les dosages suivants :

— chlore et sodium sérique (métabolisme hydro-minéral) ;
— phosphate et calcium sérique (métabolisme phospho-calcique) ;
— glycémie (métabolisme glucidique) ;
— cholestérol total et estérifié, phospolipides (métabolisme lipidique) ;
— protéines sériques (complété par les protéinogrammes), urée sanguine (métabolisme protidique).

Parallèlement, nous avons pratiqué sur l'urine des mêmes animaux les dosages du sodium, du potassium, du calcium et des phosphates, ainsi que de l'urée.

**Résultats :**

L'observation du comportement et de l'état des animaux durant le traitement démontre qu'il n'y a pas eu de perturbations sérieuses, le poids des sujets traités variant d'ailleurs identiquement à celui des témoins. Ce fait est confirmé par les faibles variations des résultats de toutes les déterminations biochimiques effectuées sur les sujets traités et témoins.

Etant donné le nombre réduit d'animaux mis en expérience, nous ne nous croyons pas autorisé à les interpréter dans le sens d'une perturbation.

## B. — ESSAIS SUR COBAYES

Nous avons traité par les mêmes procédés une soixantaine de Cobayes femelles, après les avoir divisés en quatre lots : un lot témoin et trois lots traités :

A. — Par une quantité d'infusé correspondant à 15 g de drogue sèche par kg d'animal ;

B. — Par une dose correspondant à 10 g/kg ;

C. — Par une dose correspondant à 5 g/kg.

Le premier groupe a été traité deux fois, à 24 heures d'intervalle, le deuxième trois fois en 48 heures, le troisième quotidiennement pendant 8 jours. Après quoi, ils ont tous été sacrifiés.

Les mêmes examens que pour les Lapins ont été effectués sur le sang et l'urine.

**Résultats :**

L'évolution des poids des animaux (fig. 43) indique une diminution progressive, en liaison avec la perte d'appétit de ceux-ci.

Les conclusions que nous pensons pouvoir énoncer à l'examen des résultats d'ordre biochimique sont les suivantes :

1° Pour le groupe A, nous ne constatons de modification nette que dans les deux domaines suivants :

— la glycémie, dont la moyenne passe de 1,20 à 1,80 g de glucose/l de sang (mais au moment de l'agonie, elle s'effondre à 0,60-0,30 et même 0,10 g de glucose) ;

— l'urée sanguine qui augmente de 0,42 à 0,68 g/l.

L'urée urinaire n'est guère modifiée. Le potassium, le sodium et le calcium urinaire sont en très nette régression compte tenu de la diurèse, qui est fortement diminuée.

Cette intoxication semble donc perturber sensiblement le métabolisme glucidique. Quant à l'élévation du taux de l'urée, plutôt qu'une atteinte rénale, elle pourrait peut-être être rapportée à l'oligurie manifestée.

2° Le groupe B ne démontre de perturbation notable que dans la protéinémie qui est en baisse sensible. Dans l'urine, nous retrouvons une concentration faible en éléments minéraux : potassium, sodium, calcium, à l'exception des phosphates.

3° Le groupe C subit une perturbation analogue des protéines sériques. L'électrophorèse indique une légère hypoalbuminémie. Il y aurait également une faible diminution de la calcémie accompagnée d'une hypocalciurie et d'une hypophosphatémie. Peut-on mettre ceci en relation avec une éventuelle perturbation du fonctionnement parathyroïdien sous l'influence de la drogue ?

A l'autopsie, les principaux organes ont été prélevés pour l'histologie. Leur examen n'a pas révélé de lésions manifestes.

Des contrôles hématologiques ont été effectués et la numération des cellules sanguines ne signale pas de variations interprétables.

Les conditions expérimentales ne nous ont pas permis des explorations plus complètes et plus nombreuses.

# CONCLUSIONS DE L'ÉTUDE PHYSIOLOGIQUE

Les recherches physiologiques précédentes mettent en évidence les faits suivants :

1° *La symptomatologie de l'intoxication* par *Lycopodium phlegmaria* L. a été précisée sur la Grenouille, la Souris, le Cobaye, le Lapin. Cette drogue s'est révélée développer une nette activité neurotrope. Il s'agit d'un *excitant central*, ainsi qu'en témoignent les manifestations convulsives (phases clonique et tonique caractérisées) provoquées par les doses massives.

2° *La toxicité de la drogue* utilisée sous diverses formes : infusé, teinture et alcaloïdes totaux, et administrée par deux voies (per os et intrapéritonéalement) a été évaluée sur la Souris blanche. Une telle étude fait apparaître que, pour tuer 50 % des animaux mis en expérience, il faut leur faire absorber une dose d'infusé correspondant à 100 g de drogue sèche par kg, ou leur administrer par voie intrapéritonéale, sous forme de teinture, une dose correspondant à 23 g de drogue sèche par kg, ou encore 50 mg d'alcaloïdes totaux par kg (toujours par voie intrapéritonéale) représentant environ 20 g de drogue sèche.

Il n'a pas paru utile de chercher à étudier avec plus de précision la toxicité fine de cette substance pour l'animal, car, par définition, tout matériel végétal est susceptible de grandes modifications dans sa composition chimique sous l'influence de nombreux facteurs, en particulier saisonniers, et d'ailleurs nous avons nous-même trouvé de notables différences dans le pourcentage des alcaloïdes, en traitant deux lots successifs. Notre but était d'en reconnaître l'agressivité première.

3° Les observations notées au cours des essais toxicologiques ont trouvé une explication partielle dans la mise en œuvre des *techniques physiologiques appliquées au Lapin :*

a) la *vasodilatation périphérique*, remarquée déjà sur la Souris a été confirmée ;

b) il en a été de même de l'*action excitante centrale*. Les centres respiratoires sont particulièrement influencés et cette action a pu être nettement démontrée sur des sujets ayant subi au préalable les effets dépresseurs de la morphine.

La stimulation bulbaire est ainsi manifeste.

4° Les *effets cardiaques* ont été plus précisément analysés *sur la Grenouille* : effets chronotrope et inotrope négatifs avec atteinte primitive de la contraction auriculaire. Ces effets sont à rapporter essentiellement, semble-t-il, aux alcaloïdes et plus particulièrement à l'alcaloïde A principal.

5° Les effets *sur la musculature lisse,* étudiés par la technique de l'*intestin isolé de Rat,* démontrent une action très nette de la drogue sur la motilité intestinale expliquant l'hyperpéristaltisme qui s'était manifesté chez les Souris par des défécations abondantes. Dans ce cas, la participation des alcaloïdes à cette activité paraît assez modeste.

6° Des déterminations biochimiques ont été également pratiquées pour examiner les répercussions possibles de l'ingestion de *Lycopodium phlegmaria* L. sur les divers métabolismes (glucidique, lipidique, protidique, hydro-minéral, phospho-calcique). Effectuées sur Lapins et Cobayes, elles ont été complétées par des contrôles hématologiques et histologiques.

Les premiers résultats indiquent essentiellement une perturbation dans le domaine glucidique lorsqu'on utilise des doses importantes (15 g de drogue sèche/kg d'animal) dans le cas du Cobaye ; dans le cas de doses faibles administrées plus longuement (5 g de drogue sèche/kg pendant 8 jours), il y aurait plutôt une légère perturbation des métabolismes protidique et phospho-calcique.

# CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Des faits essentiels qui ressortent de l'ensemble de nos recherches botaniques, biochimiques et physiologiques, entreprises sur *Lycopodium phlegmaria* L., et qui ont déjà été présentés en conclusion de chacune des parties de ce travail, nous retiendrons les suivants :

**1° Recherches botaniques :**

Les examens morphologiques et anatomiques ont permis de confirmer les travaux antérieurs tout en précisant quelques points. Une étude microchimique nous a montré l'existence d'alcaloïdes localisés dans des cellules non différenciées du parenchyme cortical, à l'intérieur de tous les organes végétatifs.

**2° Recherches chimiques :**

Notre effort a été essentiellement dirigé sur l'analyse des principes actifs de nature alcaloïdique que nous avons mis en évidence et isolés. Parmi les 11 alcaloïdes que nous avons pu reconnaître, nous en avons complètement isolé 6, et leur étude a permis d'identifier l'un d'eux avec la lycopodine, que nous nous attendions à trouver, puisque cet alcaloïde est présent dans la plupart des espèces de lycopodes étudiés à ce jour. Nous avons aussi émis la probabilité de la présence de la lycodine. Un troisième alcaloïde est très voisin, mais lègèrement différent de L 8. Nous avons pu montrer que tous les autres alcaloïdes, dont l'alcaloïde principal, ne s'identifient pas aux 15 alcaloïdes de référence que nous possédons, et nous avons pu fournir quelques renseignements de structure sur eux.

**3° Recherches physiologiques :**

Effectuées sur divers animaux de laboratoire : Grenouille, Souris, Rat, Cobaye, Lapin, ces recherches ont essentiellement mis en évidence les faits suivants :

*Lycopodium phlegmaria L.* est un excitant central.

Les symptômes des intoxications expérimentales consistent en des phénomènes convulsifs caractérisés (la toxicité aiguë en

a été évaluée pour la Souris). Les centres respiratoires se montrent sensibles à la drogue qui démontre ainsi son action stimulante bulbaire. Enfin il se signale une vasodilatation périphérique fugace.

Les effets cardiaques sur la Grenouille se traduisent par une action chronotrope et inotrope négative.

La musculature lisse intestinale est très sensible à la drogue, expliquant ainsi l'hyperpéristaltisme noté sur l'animal entier.

Les répercussions biochimiques essentielles d'une intoxication chronique sur le Lapin et le Cobaye ont été envisagées dans quelques essais portant sur les divers métabolismes (glucidique, protidique, lipidique, hydro-minéral).

Ainsi ces recherches peuvent-elles contribuer à une meilleure connaissance de cette Lycopodiacée malgache, apportant peut-être une explication partielle de son utilisation populaire, mais se gardant de la justifier et en signalant les dangers.

# BIBLIOGRAPHIE


1. — ACHMATOWICZ et RODEWALD. — *Roczniki Chem.*, 1956, 30, 233.
2. — ACHMATOWICZ et RODEWALD. — *Roczniki Chem.*, 1958, 32, 485.
3. — ACHMATOWICZ et UZIEBLO. — *Rocznicki Chem.*, 1938, 18, 88.
4. — ADAMS (R.). et GOVINDACHARI (T.-R.). — Senecio alkaloids : the alkaloids of Senecio Douglasii, Carthamoides, Eremophilus, Ampullaceus and Parksii. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1949, 71, 1956.
5. — ADRIAN. — *C.R. Ac. des Sciences*, 1886, 102, 1322.
6. — ANET (F.-A.-L.) et EVES (C.-R.). — Lycodine, a new alkaloid of Lycopodium annotinum. *Can. J. of Chem.*, 1958, 36, n° 6, 902.
7. — ANET (F.-A.-L.) et KHAN (N.-H.). — Alkaloids of Lycopodium annotinum, part II, isolation of four new alkaloids. *Can. J. of Chem.*, 1959, 37, 1589.
8. — ANET (F.-A.-L.) et KHAN (N.-H.). — Structure of annofoline, an alkaloid of Lycopodium annotinum, *Chem. and Ind.*, 1960, 40, 1238.
9. — APPLEZWEIG (N.). — Chinchona alkaloids prepared by ion exchange. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1944, 66, 1990.
10. — ARATA (P.) et CANZONERI (F.). — Contributo allo studio del pillijan L. saururus. *Gazz. Chim. Ital.*, 1892, 22, 146 à 150.
11. — ASMIS (H.), BÆCHLI (E.), GIESBRECHT (E.), KEBRLE (J.), SCHMID (H.) et KARRER (P.). — Ueber weitere aus Calebassen isolierte quartære Alkaloïde. *Helv. Chim. Acta*, 1954, 37, 1968.
12. — AYER (W.-A.) et IVERACH (G.-G.). — The structure of lycodine. *Can J. of Chem.*, 1960, 38, 1823.
13. — AYER (W.A.) et IVERACH (G.-G.). — The structures of $\alpha$ and $\beta$ obscurines. *Tetrahedron*, 1960, 10.
14. — BATE-SMITH (E.-C.) et WESTALL (R.-G.). — Chromatographic behaviour and chemical structure : I. some naturally occurring phenolic substances. *Biochim. et Biophysica Acta*, 1950, 4, 427.
15. — BERTHO (A.) et STOLL (W.-A.). — 1952, B-85, 663.
16. — BIZERTE (G.), PLAQUET-SCHOONAERT (Th.), BOULANGER (P.) et PAYSANT (P.). — Séparation des acides aminés des milieux biologiques complexes. V. Description d'un couplage de méthodes chromatographiques et électrophorétiques. *J. of Chromatog.*, 1960, 3, 25.
17. — BODEKER (K.). — Lycopodin, das erste Alkaloïd der Gefæsskryptogamen. *Ann. Chem.*, 1881, 208, 363 à 367.
18. — BOIT (H.-G.). — Ergebnisse der alkaloid chemie bis 1960.
19. — BOULANGER (P.) et BIZERTE (G.). — Chromatographie sur papier des acides aminés et polypeptides des liquides biologiques. II. Modifications techniques et résultats nouveaux (plasma sanguin). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1951, 33, 1930.
20. — BOURQUELOT, HERISSEY. — *Jour. Pharm. Chim.*, 1911, 3, 147.
21. — BRUNEL (A.). — Traité pratique de chimie végétale. Ed. G. Tourcoing, 1949, III, 273.

22. — Buchi (J.) et Schumacher (H.). — *Pharm. Acta Helv.*, 1957, 32, 75.

23. — Burnell (R.-H.). — Lycopodium alkaloids : part I : extraction of alkaloids from Lycopodium Fawcettii Loy and Underwood. *J. Chem. Soc.*, 1959, 3091.

24. — Burnell (R.-H.), Mootoo (B.-S.) et Taylor (R.). — Alkaloids of Lycopodium Fawcettii, part. II. *Can. J. of Chem.*, 1960, 38, 1927.

25. — Burnell (R.-H.) et Taylor (D.-B.). — Fawcettiine and clavolonine. *Chem. and Ind.*, 1960, 40, 1239.

26. — Capdeville (Ch.). — Etudes botaniques, chimiques et physiologiques sur Pillijan (L. Saururus). Thèse de Paris, 1886.

27. — Carless (J.-E.) et Woodhead (H.-B.). — Separation of alkaloids by paper chromatography. *Nature*, 1951, 168, 203.

28. — Christensen (C.). — Catalogue des plantes de Madagascar — Pteridophyta, 60/70.

29. — Conroy (H.). — Biogenesis of Lycopodium alkaloids. *Tetrahedron*, 1960, 10.

30. — Craig (L.-C.). — Counter-current distribution and some of its applications. *Forschr. Chem. Forsch*, I, 1949, 292 à 324.

31. — Deulofeu (U.). et de Langhe (J.). — Studies on Argentin's plants. III. : alkaloids from L. saururus. *J. of the Amer. Chem. Soc.* 1942, 64, 4, 968.

32. — Dominguez (J.-A.). — Lycopodium saururus L., vulg. « Pillijan ». *Rev. Centra Estud. Farmacia Biochim.*, 1931, 20, 534/47.

33. — Douglas (B.), Lewis (D.-G.), Marion (L.). — *Can. J. Research*, 1953, B 31, 272.

34. — Faugeras (G.). — Contribution à l'étude des alcaloïdes et flavonoïdes chez quelques Genistées indigènes à l'aide de l'électrophorèse. Thèse Doct. Pharm. (Etat) Paris, 1956.

35. — French (W.-N.) et Mac Lean (D.-B.). — Structure of acrifoline. *Chem. and Ind.*, Londres, 1960, 10, 659.

36. — Goris (A.), Liot (A.). — Pharmacie galénique, Masson, éd., Paris, 1939.

37. — Grobbelaar (N.), Pollard (J.-K.), Steward (F.-C.). — New soluble nitrogen compounds (amino and imino acids and amines) in plants. *Nature*, 1955, 175, 703.

38. — Harisson (W.-A.) et Mac Lean (D.-B.). — The structure of lycopodine. *Chem. and Ind.*, Londres, 1960, 10, 261.

39. — Hermig (A.-J.), Higuchi (T.) et Parks (C.-M.). — *J. Amer. Pharm. Assoc.* (Sci. ed.), 1951, 40, 168.

40. — Hert. — In Bot. Ark., 1923, 3, 17.

41. — Hill (J.-B.). — In Cryptogamic Botany, 1914.

42. — Karlson (P.) et Hecker (E.). — *Z. Naturforschung*, 1950, 5B, 237/246.

43. — Le Hir (A.), Goutarel (R.) et Janot (M.-M.). — Extraction et séparation de la yohimbine et de ses stéréoisomères. *Ann. Pharm. Franc.* 1953, 7/8, 546.

44. — Mc Cormick et Smith. — *Ind. Eng. Chem. Anal.*, 1946, 18, 508.

45. — Mannich, Lesser et Silten. — Ber. 1932, 65, 378.

46. — Mac Lean (D.-B.), Manske (R.-H.-F.) et Marion (L.). — The alkaloids of Lycopodium species. XI : Nature of the oxygen atom in lycopodine ; some reactions of the base. *Can. J. Res.*, 1950, 28, 460.

47. — Manske (R.-H.-F.) et Marion (L.). — The alkaloids of Lycopodium species I : Lycopodium complanatum L. *Can. J. Res.*, 1942, 20, 87/92.

48. — MANSKE (R.-H.-F.) et MARION (L.). — The alkaloids of Lycopodium species III : L. annotinum. *Can. J. Res.*, 1943, B 21, 92.

49. — MANSKE (R.-H.-F.) et MARION (L.). — The alkaloids of Lycopodium species IV : Lycopodium tristachyum PURSH. *Can. J. Res.*, 1944, B 22, 1 à 4.

50. — MANSKE (R.-H.-F.) et MARION (L.). — The alkaloids of Lycopodium species V : Lycopodium obscurun L. *Can. J. Res.*, 1944, B 22, 53.

51. — MANSKE (R.-H.-F.) et MARION (L.). — The alkaloids of Lycopodium species VI : Lycopodium clavatum L. *Can. J. Res.*, 1944, B 22, 137.

52. — MANSKE (R.-H.-F.) et MARION (L.). — The alkaloids of Lycopodium species VII : Lycopodium lucidulum MICHX. *Can. J. Res.*, 1946, B 24, 57.

53. — MANSKE (R.-H.-F.) et MARION (L.). — The alkaloids of Lycopodium species VIII : Lycopodium sabinaefolium MICHX. *Can. J. Res.*, 1946, B 24, 63.

54. — MANSKE (R.-H.-F.) et MARION (L.). — The alkaloids of Lycopodium species IX : Lycopodium annotinum, variété acrifolium FERN. *J. of the Amer. Chem. Soc.*, 1947, 69, 2126.

55. — MANSKE (R.-H.-F.). — The alkaloids of Lycopodium species XIII : Lycopodium densum LABILL. *Can. J. of Chem.*, 1953, 31, 10, 894.

56. — MARION (L.) et MANSKE (R.-H.-F.). — The alkaloids of Lycopodium species II : Some degradation experiments with lycopodine. *Can. J. Res.*, 1942, 90, 153.

57. — MARION (L.) et MANSKE (R.-H.-F.). — Lycopodium cernuum. *Can. J. Res.*, 1948, 26, 1.

58. — MARONI (P.). — Etude de l'influence de l'environnement moléculaire sur les propriétés spectroscopiques du groupe carbonyle en U.V. et I.R.. Thèse présentée à la Faculté des Sciences de Paris, Masson éd. 1958.

59. — MONTANT (Ch.), TOUZE-SOULET (J.-M.) — Electrophorèse sur poudre de cellulose des acides aminés. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1960, 42, 161/66.

60. — MOORE (B.-P.) et MARION (L.). — $\alpha$ and $\beta$ obscurine. *Can. J. of Chem.*, 1953, 31, 10, 952.

61. — MUNIER (R.) et MACHEBŒUF (M.). — Microchromatographie de partage des alcaloïdes et de diverses bases azotées biologiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, 31, 1144

62. — MUNIER (R.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1952, 852.

63. — MUSZYNSKI (J.). — Alkaloïd europejskich gatunkow Lycopodium. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 1934, II, n° 3, 278/86.

64. — MUSZYNSKI (J.). — The alkaloïds of clubmosses — Quart. *J. Pharm. a Pharmacol.*, 1948, 21, I, 34/38.

65. — OFICJALSKI (P.). — Contribution à l'étude de la toxicité des alcaloïdes de lycopodes. *Bull. Sciences Pharmacologiques*, 1937, 10, 470.

66. — PARIS (R.). et GOUTAREL (R.). — Les Alchornea africains : présence de Yohimbine chez l'Alchornea floribunda (Euphorbiacées). *Ann. Pharm. Franç.*, 1958, n° 1, 15

67. — PARIS (R.) et FAUGERAS (G.). — Application de l'électrophorèse à la séparation des alcaloïdes et des dérivés flavoniques chez quelques Légumineuses. *Ann. Pharm. Franç.*, 1955, 5, 359.

68. — PARIS (R.) et FAUGERAS (G.). — A propos du dosage des alcaloïdes des Jusquiames. *Ann. Pharm. Franç.*, 1956, 7/8, 537.

69. — PARTRIDGE. — Aniline hydrogen phtalate as a spraying reagent for chromatography of sugars. *Nature*, 1949, 164, 443.

70. — Perry (G.-S.) et Mac Lean (D.-B.). — Lycopodium alkaloids III : functional groups of some minor alkaloids of L. annotinum. *Can. J. of chem.*, 1956, 2, 34, 1188.

71. — Przybylska (M.) et Marion (L.). — The crystal and molecular structure of annotinine bromhydrine. *Can. J. of Chem.*, 1957, 35, 1075.

72. — Smith (G.). — Cryptogamic Botany II, 1938. New-York, Mc Graw-Hill Book Cy.

73. — Tardieu-Blot (Mme). — Ptéridophytes d'Afrique inter-tropicale française in « Mélanges biologiques », mém. I.F.A.N., 1957, 50, 20/25.

74. — Thomas (G.) et Roland (P.). — Chromatographie sur papier : essai d'orientation pour identification des alcaloïdes en mélange. *Ann. Pharm. Fr.*, 1954, 12, 318.

75. — Valenta (Z.), Yoshimura (H.), Roger (E.-F.), Ternbach (M.) et Wiesner (K.). — The structure of selagine. *Tetrahedron*, 1960, 10, 26.

76. — Virtanen (A.), Berg (A.-M.). — *Acta Chem. Scand.*, 1955, 3, 553.

77. — Wiesner (K.), Valenta (Z.), Ayer (W.-A.) et Bankiewicz (C.). — The structure of annotinine. *Chem. and Ind.*, Londres, 1956, 38.

78. — Wiesner (K.), Ayer (W.-A.), Fowler (L.-R.), Valenta (Z.). — *Chem. and Ind.*, 1957, 564.

79. — Wiesner (K.), Valenta (Z.), Ayer (W.-A.), Fowler (L.-R.), Francis (J.-E.) — Annotinine II : the complete structure. *Tetrahedron*, 1958, 4, 87 à 104.

80. — Zaffaroni (A.) et Burton (R.-B.). — Identification of corticosteroids of beef adrenal extract by paper chromatography. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 749.

# INDEX ALPHABÉTIQUE DES ALCALOIDES DE LYCOPODES


Acétyl-dihydro-lycopodine, 41.
Acétyl-fawcettiine, 31-41.
Acrifoline, 29-30-32-34-38-42-61-72-76-77.
Alcaloïde A, 54-57-59-60-61-76-77-82-83-106-123.
Alcaloïde B, 54-57-59-60-61-72-75-77-82-83-106-123.
Alcaloïde C, 54-57-59-60-61-72-76-83-106.
Alcaloïde D, 57-59-61-106.
Alcaloïde E, 57-59-60-61-72-76-77-106.
Alcaloïde F, 57-59-60-61-72-75-77-83-106.
Alcaloïde G, 57-59-60-82-106.
Alcaloïde H, 57-59-60-82-106.
Alcaloïde I, 59-61-76-77-82-106.
Alcaloïde J, 60-61-72-77-82-83-106.
Alcaloïde K, 61-72-77-82-83-106.
Annofoline, 31-32-33-39-42-106.
Annotine, 30-31-32-38-72-75-110.
Annotinine, 27-28-29-32-36-38-42-61-72-75-109.
Annotoxine, 29-30-60.
Base A (de Burnell), 31-40.
Base B, 31-40.
» C, 31-40.
» D, 31.
» E, 31-40.
» F, 31.
» G, 40.
» K, 31-33-40.
» M, 31-40.
» N, 31-40.
» O, 31-40.
Base IV (Achmatowicz), 30-38.
» V, 30-40.
» VI, 30-38.
» VII, 31-40.
» VIII, 30-38.
» IX, 30-40.
» X, 40.
» XI, 31-40.
» XII, 31,40.
Cernuine, 39.
Clavatine, 27-28-39-61-72-76-109.
Clavatoxine, 27-28-40.
Clavolonine, 33-39-42-61-72-76-77.
Complanatine, 27-28-41-109-110.
Desacétyl-fawcettiine, 31-33-40.
Di-acétyl-lycofoline, 31-41.
Di-hydro-fawcettiine, 33.
Di-hydro-lycopodine, 42-60-72-76.
Fawcettidine, 31-38.
Fawcettiine, 31-33-37-41.
Inundatine, 27-109.
Isolycopodine, 39.
L 1, 28-40.
L 2, 28-40.
L 3, 28-40.
L 4 ,28-39.
L 5, 28-40.
L 6, 28.
L 7, 28-38.
L 8, 29-32-37-39-60-61-72-75-76-77-83-106.
L 9, 28-39.
L 10, 28-39.
L 11, 28-32-38.
L 12, 28-32-40.
L 13, 28-39.
L 14, 28-39.
L 15, 28-40.
L 16, 29-39.
L 17, 29-40.
L 18, 28-38.
L 19, 28-40.
L 20, 29-40.
L 21, 29-38.
L 22, 29-40.
L 23, 29-39.
L 24, 29-39.
L 25, 29-39.
L 26, 29-38.
L 27, 29-32.
L 28, 29-40.
L 29, 29-38.
L 30, 29-37-39.
L 31, 29-40.
L 33, 40.
L 34, 39.
L 35, 38.
Lofolines, 31-33-41-42-61-72-76-82.
Lycofoline, 31-32-39-106.
Lycodine, 30-32-34-35-37-38-40-42-61-72-75-77-82-83-136.
Lycopodine, 27-28-29-30-31-34-35-39-42-60-61-72-75-77-83-106-136.
Nicotine, 28-29.
O-acétyl-acrifoline, 32-40.
Obscurines, 28-29-30-32-34-35-37-40-42-61-72-75.
Pillijanine, 27-38-109
Pseudo-sélagine, 39.
Sauroxine, 28-40.
Saururine, 28-38.
Sélagine, 27-37-38-42-109-110.

# TABLE DES MATIÈRES


AVANT-PROPOS ..... 9

PLAN ..... 11

ETUDE BOTANIQUE ..... 13

Introduction ..... 15
Répartition géographique de L. phlegmaria.... 16
Etude morphologique ..... 17
Etude anatomique ..... 19
Essais de localisation des alcaloïdes..... 20
Conclusions ..... 23

ETUDE CHIMIQUE ..... 25

Travaux antérieurs ..... 27

Travaux personnels ..... 43

I. — *Extraction et examens préliminaires*..... 43

Recherche des sucres..... 45
Recherche des acides aminés..... 45
Recherche des principes hétérosidiques..... 46
Recherche de la nicotine..... 47

II. — *Etude des alcaloïdes*..... 48

1) Etude du bloc alcaloïdique..... 48
Essais colorés-purification-essais divers.... 48
Chromatographie sur papier..... 50
Electrophorèse sur papier..... 51
Electrochromatographie ..... 52

2) Fractionnement des alcaloïdes..... 53
Chromatographie sur colonne..... 53
Procédé du contre-courant..... 55

3) Purification des alcaloïdes..... 59

4) Etude de leur structure..... 60
A) Par chromatographie sur papier et électrophorèse ..... 60
B) Par spectrographie U.V..... 75
C) Par spectrographie I.R..... 82

5) Conclusions de l'étude chimique..... 106

ETUDE PHYSIOLOGIQUE ..... 107

Travaux antérieurs ..... 109

Travaux personnels ..... 111

I. — *Etude toxicologique* ..... 111

1) Action sur la Grenouille ..... 111
2) Action sur la Souris ..... 111
3) Action sur le Cobaye ..... 113
4) Action sur le Lapin ..... 113
Détermination des doses toxiques ..... 114

II. — *Effets physiologiques* ..... 116

A) Sur Lapin ..... 116
B) Sur cœur de Grenouille in situ ..... 120
C) Sur intestin isolé de Rat ..... 126

III. — *Recherches biochimiques* ..... 130

A) Sur Lapin ..... 130
B) Sur Cobaye ..... 132
Conclusions de l'étude physiologique ..... 134

CONCLUSIONS GENERALES ..... 137

BIBLIOGRAPHIE ..... 139

INDEX ..... 143

*Question posée par la Faculté :*

LES PHOSPHOLIPIDES DE LA GRAINE DE COLZA

Vu : Le Président de Thèse,
Th. DULUCQ.

Vu : Le Doyen,
LAZORTHES.

*Vu et permis d'imprimer :*

Toulouse, le 2 avril 1962.

Le Recteur,
*Président du Conseil de l'Université,*
DOTTIN.

Imprimerie du Centre — Toulouse — Dépot dégal, 4me trimestre 1962